

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

A LÉGZÉSFUNKCIÓS ELTÉRÉSEK SÚLYOSSÁGÁVAL KORRELÁLÓ
COPD BIOMARKER JELŐLTEK FELFEDEZÉSE

Dr. Csánky Eszter



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA
Debrecen, 2012.

TARTALOMJEGYZÉK

	OLDALSZÁM
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4.
1. BEVEZETÉS	5.
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6.
2.1. A COPD EPIDEMIOLOGIAI ADATAI ÉS ETIOLOGIAI TÉNYEZŐI	
2.1.1. A COPD epidemiológiai adatai világszerte és Magyarországon	6.
2.1.2. A COPD etiológiai tényezői	7.
2.2. A COPD KLINIKUMA	8.
2.2.1. A COPD definíciója, klinikai képe, és stádiumbeosztása	8.
2.2.2. A COPD szisztémás betegség	10.
2.2.3. A COPD kezelése	11.
2.2.3.1. A jövő terápiás lehetőségei	13.
2.3. A COPD PATOMECHANIZMUSA	13.
2.3.1. Cigaretta füst és gyulladás	13.
2.3.2. Genetikai és génkifejeződési tényezők szerepe a COPD kialakulásában	13.
2.3.2.1. Alfa-1 antitripszin hiány	14.
2.3.3. Sejtes elemek aktivációja	15.
2.3.4. Gyulladásos mediátorok és szöveti károsodás	17.
2.3.5. Lipid mediátorok	18.
2.3.6. Szöveti javító mechanizmusok, úgynevezet „repair” mechanizmusok	20.
2.4. A BIOMARKEREK JELENTŐSÉGE	20.
2.4.1. A pulmonológiai megbetegedések biomarkerei és azok forrásai, különös tekintettel a COPD biomarkereire	21.
2.4.1.1. Az indukált köpet vizsgálata	22.
2.4.1.2. Kilégzett levegő kondenzátum	22.
2.4.1.3. Perifériás vérben található biomarkerek	22.
2.4.1.4. Vizeletben található markerek	23.
2.4.1.5. Bronchoalveoláris lavage és bronchiális biopszia	23.
2.5. A COPD KUTATÁS KEZDETEI A DEBRECENI EGYETEMEN	24.
2.6. CÉLKITŰZÉSEK	26.
3. BETEGEK, ANYAGOK, MÓDSZEREK	27.
3.1. BETEGEK BEVÁLASZTÁSÁNAK ÁLTALÁNOS ELVEI	27.
3.1.1. Légzés funkciós vizsgálatok és reverzibilitási teszt	27.
3.1.2. Bronchoalveoláris lavage (BAL)	28.
3.2. MÓDSZEREK: A BIOMARKEREK FELFEDEZÉSE ÉS KVALIFIKÁLÁSA	29.
3.2.1. A minták előkészítése az antigén preparátum készítéséhez	29.
3.2.2. Monoklonális antitest előállítás	29.
3.2.3. Hybridoma felülűszók szűrése, a COPD-re specifikus monoklonális IgG előállítása és kvalifikálása	29.
3.2.4. Fehérje identifikáció LC-MS/MS használatával	30.
3.3. MÓDSZEREK: A LIPID METABOLIT ASSAY	31.
3.3.1. A BAL folyadék előkészítése	31.
3.3.2. Lipid HPLC-MS	31.
3.3.3. A lipidek azonosítása	31.
4. EREDMÉNYEK	
4.1. MONOKLONÁLIS ANTITEST GENERÁLÁS	32.
4.1.1. Klinikai adatok a monoklonális antitest generálásban részt vett betegekről	32.
4.1.2. A COPD-re jellemző specifikus biomarker jelölt monoklonális ellenanyagok és fehérjék.	32.

4.1.2.1 Az immunogén előállításához és az első ellenanyag szűrési lépéshez felhasznált COPD-s betegek és kontroll egyének plazma proteomuk jellemzői.	33.
4.1.3 Monoklonális antitest előállítás	36.
4.1.4 Monoklonális antitestek szűrése	36.
4.2 LIPID METBOLITOK VIZSGÁLAT EREDMÉNYEI	39.
4.2.1 Betegek adatai lipid metbolitok vizsgálatban	39.
4.2.2. A BAL-ban mérhető lipid metabolitok	40.
4.2.3. A BAL lipid tartalma és a légzésfunkció összefüggései	44.
5. MEGBESZÉLÉS	
5.1. A BIOMARKER KUTATÁS ÉS ALKALMAZÁSA A JÖVŐ KLINIKUMÁBAN: MOLEKULÁRIS MEDICINA	44.
5.1.1.Fehérje biomarker kutatási technológiák: összevetés a monoklonális ellenanyag proteomikával eredményeink fényében	45.
5.2 LIPID BIOMARKER VIZSGÁLAT	48.
6. ÖSSZEFOGLALÁS	52.
6.1 SUMMARY	53.
7. IRODALOMJEGYZÉK	
7.1 PH.D ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK DEENK	54.
7.1.1 TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK DEENK	55.
7.2 IDÉZETT KÖZLEMÉNYEK	59.
8. TÁRGYSZAVAK	65.
8.1 KEY WORDS	65.
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	66.
10. FÜGGELÉK: A PH.D ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK MELLÉKELVE	67
10.1 Eszter Csanky , Petra Olivova, Eva Rajnavolgyi, William Hempel és mtsai: Monoclonal Antibody Proteomics: Discovery and Pre-Validation of COPD Biomarkers in a Single Step. Electrophoresis 2007, 28, 4401–4406	68.
10.2. Eszter Csanky , Ralph Rühl, Beata Scholtz, Attila Vasko, Laszlo Takacs: Lipid metabolite levels of prostaglandin D ₂ and eicosapentaenoic acid recovered from bronchoalveolar lavage fluid correlate with lung function of chronic obstructive pulmonary disease patients and controls. Electrophoresis. 2009 30:1228-34.	74.
10.3. Csánsky Eszter : A krónikus obstruktív tüdőbetegség patogenezeise – legfontosabb ismereteink 2011-ben. Orvostovábbképző szemle 2011. 18:10, 11-18	81.
10.4. Csánsky. Eszter , Takács László: A biomarkerek szerepe a COPD patogenezisében Tüdőgyógyászat, 2007, 12: 3-11.	89.
10.5. Csánsky Eszter : A betegek kiválasztása tüdőtranszplantációra és kezelésük a várólistán. Orvosi Hetilap 2006. 147: 43: 2069-2074	98.
10.6. Vaskó Attila, Sz. Kiss Sándor, Dévényi Katalin, Ördög Csilla, Szilasi Mária, Csánsky Eszter : A volumenreductio műtét, mint kezelési lehetőség korai stádiumú COPD terápiájában. Orvosi Hetilap 2006. 147: 43: 2091-2096.	104.
10.7. Csánsky Eszter : A COPD gyógyszeres kezelése napjainkban és a jövőben, Családorvosi Fórum 2006/9 12-18.	110.

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

A1AT: alfa-1 antitripszin	ISZB: ischaemias szívbetegség
BAL: bronchoalveoláris lavage	IVC: inspiratorikus vitálkapacitás
BF: bronchofiberoscopia	LC: liquid kromatografia
BMI: testtömeg index (Body Mass Index)	LF: légzésfunkció
BSI: BioSystems International SAS	LPC: lysophosphatidylcholine
CAT: COPD Assesment Test	LTB4: leukotrién B4
CFI: protein kemotaktikus faktor gátló	MPO: serum myeloperoxidase
COPD: krónikus obstruktív tüdőbetegség	MMP: mátrix metalloproteináz
CRP: C reaktív protein	MRM: multiple reaction monitoring;
CXCR2: kemokin receptor	mMRC: Modified Medical Research Council Questionnaire
DALY: disability-adjusted life year	MS: tömegspekrometria mass spectroscopy
DE OEC: debreceni Egyetem, Orvos és Egészségtudományi Centrum	NCF: neutrofil kemotaktikus faktor
ECP: eozinofil kationos fehérje	NIH: National Institute of Health
EDP: elastin-derived peptides	NF-κB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
DHA: decosahexen sav	NO: nitrogén monoxid
ELISA: enzyme linked immuno assay	PAF: platelet activating factor
ERS: European Respiratory Society (Európai Tüdőgyógyász Társaság)	PBS: foszfáttal pufferolt NaCl oldat
EPA, eicosapentaen sav	PEF: peak expiratory flow, kilégzési csúcsáramlás
EPO: erythropoetin	PgE₂: prosztaglandin E ₂
5-oxo-ETE: eicozanoid 5-oxo-6E,8Z,11Z, 14Z-eicosatetraén sav	PgD₂: prosztaglandin D ₂
FBS: fetal bovine serum	PLA2: endogén foszfolipáz
FEV₁: forszírozott expiratorikus volumen (az első másodpercben)	PPARγ: peroxisome proliferator-activated receptor gamma.
FEV₁%: Tiffneau szám, FEV ₁ /VC	PPY: Pack/ year csomagév dohányzás mértékének mutató száma
FRC: funkcionális reziduális kapacitás	PUFA: polyunsaturated fatty acids
FVC: forszírozott vitálkapacitás	Raw: resistance, légúti áramlási ellenállás
GERD: Gastrooesophagealis Reflux Disease	RV: reziduális volumen
GOLD: Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease	SNP: single nucleotide polymorphism
GMCSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	TEAC: trolox equivalens antioxidáns kapacitás
GROα: growth-regulated oncogene	TGF-β: transforming growth factor beta 1
HAT médium: hypoxantin, aminopterin, timidin médium	TIMP: tissue inhibitors of metalloproteinases
15-HETE: 15-hydroxyeicosatetraen sav	TLR: toll like receptor
IGV: intrathoracalis gázvolumen	TNF-α: tumor necrosis factor α
IL-1β: interleukin-1 β	TBC: tuberculosis
IL-5: interleukin-5	TLC: totál tüdőkapacitás
IL-6: interleukin-6	VC: vitálkapacitás
IL-8: interleukin-8	VEGF: vascularis endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
IL-13: interleukin-13	WHO: World Health Organisation

1. BEVEZETÉS

A GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) definíciója szerint a krónikus obstruktív légúti betegség (COPD) egy megelőzhető és kezelhető kórállapot, amelyet a perzisztáló légúti obstrukció jellemez, általában progresszív és a légutak fokozott gyulladásos reakciója hatására alakul ki, amelyet káros részecskék, gázok, és füstbelégzése okoz. Exacerbációk és a társbetegségek határozzák meg a betegség súlyosságát (1). Leggyakrabban dohányzás miatt kialakuló gyulladásos folyamatok nem csak a kislégutakat érintik, hanem a tüdő parenchymában is gyulladásos, és következményesen irreverzibilis folyamatokat generálnak, és a tüdőben zajló gyulladás mellett a kórképet néhány jelentős extrapulmonális szövődmény is súlyosbíthatja (2). A COPD-re jellemző krónikus légúti áramlás korlátozottság hátterében részben a kislégutak, bronchiolusok obstruktív megbetegedése áll (krónikus bronchitis) amihez gyakran társul a tüdőparenchyma destrukciója is (emfizéma), és ez a két folyamat egyénenként változó arányban vesz részt a betegség kialakításában.

A COPD óriási népegészségügyi problémát és anyagi terhet jelent mind a fejlett mind a fejlődő országokban, már napjainkban is, de a későbbiekben ezek terhek csak nőni fognak, ha a betegség gyógyszeres kezelésében belátható időn belül lényeges áttörés nem történik. Az elmúlt évtizedek orvos-biológiai kutatásai mostohán bántak a COPD-vel. Ennek köszönhető, hogy a betegség patomechanizmusáról, a háttérben zajló folyamatokról relatíve kevés ismerettel rendelkezünk, és ennek megfelelően nem rendelkezünk a betegség korai kórismézésére megfelelő diagnosztikai módszerrel, ezért a folyamat gyógyítására sincs lehetőségünk. A jelen dolgozatban részletezett kísérleteknek az elkezdése, 1999. óta is nagyon sokat változott a szemléletünk, a COPD-t illetően. Számos új kutatási eredmény került publikálásra az utóbbi időben, ennek ellenére a légzésfunkció romlásáért felelős tényezőt egyértelműen nem tudjuk megnevezni, nem tudjuk azt sem, hogyan lehet a légzésfunkció gyakran zuhanásszerű romlását, vagy a romlás ütemét megakadályozni, vagy legalább csökkenteni. A dohányosoknak körülbelül a 10-20 %-ában alakul ki COPD, és a COPD-s betegeknek csak 80-90%-a dohányzik. Ebből az következik, hogy a dohányzás és környezeti tényezők mellett genetikai tényezők is meghatározó szerepet játszanak a betegség kialakulásában. Fontos lenne a betegség korai stádiumának diagnosztikája, a különösen veszélyeztetettek kiemelése, éppen a légzésfunkció romlásának kezdete előtt. Ezért a korai diagnosztikára alkalmas biomarkerek felfedezése a COPD kutatásban fontos lehet. Fontos lenne azoknak az egyéneknek a korai felfedezése, akinél dohányzás hatására, az évek során COPD vagy tüdőrák fog kialakulni. Azt sem tudjuk jósolni, hogy mely dohányos emberekben fog kifejlődni COPD, kik azok, akiken a dohányzás hatására hörgőrák alakul ki, és kik azok, akiknél a dohányzás hatására nem alakul ki sem COPD, sem tüdőrák, sem más légzőszervi megbetegedés, és melyek, azok a tényezők, amelyek védenek e betegségek kialakulásától. COPD, illetve a dohányzással összefüggő biomarkerek kutatásának rövid távú célja a fenti kérdésekre választ adó biomarkerek felfedezése, validálása, és alkalmassá tétele, korai diagnosztikára, szűrővizsgálatokra, illetve közvetlen betegség melletti használatra. A biomarkerek, és a rutin diagnosztikai tesztek klinikai használatát megelőzi a markerek felfedezése, kvalifikálása és validálása. Kutatásaink a biomarkerek hosszú időt igénylő felfedezésének első lépéseit vették célba, a biomarkerek felfedezését és kvalifikálását. Munkám során a molekuláris medicina elveit követve, a proteom vizsgálatát a rendelkezésre álló ellenanyag alapú technológia hatékonysága miatt az első lépésben a vérszérumnál kezdtük. A globális metabolom vizsgálat viszont a vérben technikailag nehéz és aránytalanul drága, így először egy célzott lipid metabolit csoportot vizsgáltunk a „patológias folyamatok színterét” jelképező bronchus mosó folyadékban (BAL).

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A COPD EPIDEMIOLÓGIAI ADATAI ÉS ETIOLÓGIAI TÉNYEZŐI

2.1.1. A COPD epidemiológiai adatai világszerte és Magyarországon

Sajnos a COPD epidemiológiai adatai nehezen értelmezhetők világszerte, aminek egyik alapvető oka, az hogy az orvosok széles köre kezeli a panaszos betegeket, és csak a legsúlyosabb esetek kerülnek szakorvoshoz, és ebben a stádiumban történik meg a pontos diagnózis megállapítása. Másrészt korábban széles körben elvégzett COPD szűrések, amelyek a rizikó csoportba illetve az enyhe és középsúlyos stádiumba tartozó betegeket lettek volna hivatva kiemelni, különböző módszereket alkalmaztak, így a feltárt adataik is csak limitáltan hasonlíthatók össze. (3,4). Például, Japánban egy epidemiológiai vizsgálat 10,9%-os COPD prevalenciát igazolt, ugyanakkor a Japán Eü. Minisztérium csak 0,3%-ra becsülte az esetek számát (5). Valószínűleg nagy az aluldiagnosztizált, illetve a másik oldalon a túl diagnosztizált esetek száma.

Miközben a világszerte javulnak a „népbetegségek” mortalitási és morbiditási mutatói, elsősorban az adott betegségre vonatkozó extenzív kutatások következtében, aközben a COPD miatti halálozás több mint kétszeresére emelkedett nemcsak a fejlett országokban, hanem a harmadik világban is (6). A harmadik világ előretörése a COPD morbiditási mutatóit illetően az elmúlt évtized „eredménye” (7). 1990-ben még „csak” a 12. helyen állt a COPD a mortalitási statisztikában (8). A WHO becslése alapján a COPD az elkövetkező évtizedben az egyik vezető halálókká válik mind a fejlődő országokban, mind a nyugati világban 2030-ra a 3. helyre léphet elő, a mortalitási statisztikákban, és a haláleseteknek 7,8 %-a lesz COPD-vel magyarázható ekkor. Ennek számos oka van, de alapvetően az a legnagyobb probléma, hogy szűréseink nem elég hatékonyak, és a betegség gyógykezelésében is alapvető változásoknak kell bekövetkezni (6,9,10). Nemcsak a mortalitás, hanem a morbiditás tekintetében is aggasztóak az adatok; jelenleg a fejlett társadalmakban a lakosság 4-7%-a lehet érintett (átlagosan 6,8%), világviszonylatban kb. ez akár 10% is lehet. A statisztikai előrejelzések alapján 2030-ra a világ 40 év feletti lakosságának akár a 22 %-a szenvedhet COPD-ben (9,11,12,13). A DALY (disability-adjusted life year) érték alapján a „Top 15” megbetegedésben a 11.-ről a 7.-helyre kerül a COPD míg ugyanebben a statisztikában a TBC a korábbi 10 helyről a 25. helyre esik vissza (14). A mortalitási adatok alapján a fekete férfiak halnak meg legtöbbször COPD-ben, majd a fehér férfiak, fehér nők, és fekete nők következnek a sorban. A PLATINO vizsgálat szerint (latin Amerikában zajlott) 7,8-19,8% volt a COPD GOLD 1 stádiumnál súlyosabb esetekben prevalencia. Két életkor jelent a statisztikai adatokban meghatározó tényezőt, a COPD gyakoriságában. 40 év alatt alig van COPD-s beteg, és 60 év fölött lényegesen nagyobb a betegek száma világszerte, aminek hátterében az öregedést és nagyobb mennyiségű elszívott cigarettát jelölik meg. Ami a betegség epidemiológiai tényezőinek romlásában jelentős, az az hogy a fejlődő országok 2-3 évtized alatt prevalencia és mortalitási mutatóikban utolérték a nyugati világ statisztikáját. Kérdés, hogy ez a növekvő betegszámmal, javuló statisztikai fegyellemmel, a romló egészségügyi helyzettel, vagy szélesebb körben ellátott betegekkel magyarázható, – erre ma még biztos adatok nincsenek.

A tüdőosztályok és tüdőgondozók jelentései és adatai alapján hazánkban, 2010-ben a nyilvántartott COPD-s betegek száma körülbelül 148 000 fő volt, nők, és férfiak fele-fele arányban betegedtek meg, de ez csupán a jéghegy csúcsát jelenti (15). Mivel kezdeti szakaszban a tünetek szegényesek, nem elég specifikusak, ezért a betegek rendszerint már csak az előrehaladott állapotban kerülnek orvoshoz, így a

nyilvántartásban szinte csak a legsúlyosabb esetek szerepelnek. Összességében hazánkban közel 600-800 ezer főre becsülhető a COPD-ben szenvedők száma, azonban pontos adat nem áll rendelkezésre (16,17,18,19, 20). Egy 2000-ben közzétett szintén WHO statisztika szerint 35-74 éves férfiak COPD miatti halálozási statisztikájában 78%-kal Magyarország az első helyen állt. Ennek a statisztikának a női oldalán is a 8-10-ik helyen áll hazánk (21), és ezekben a mutatókban az elmúlt évtizedben nem történt érdemi változás.

2.1. 2. A COPD etiológiai tényezői

A COPD kialakulásában szerepet játszó tényezők közül a legfontosabb a dohányzás. Számos esetben dohányzó betegnél már más etiológiai tényezőt már nem is keresünk (22,23,24). A cigarettázás mellett a pipázás, szivarozás, de a marihuána fogyasztása is a rizikó tényezők között szerepel. A COPD kialakulásában a dohányzás mellett a passzív dohányzás meghatározó szerepet játszik (25). Emellett a környezetszennyezés és a lakáson belüli légszennyezés is a rizikó tényezők közé tartozik. A lakáson belüli légszennyezés közül, különösen a fejlődő országokban fontos szerepe van a lakásokon belül levő nyílt tüzeknek, amelyeket akár főzés, akár fűtés céljára használnak. A főzésnél keletkező gőzök is szerepet játszanak a COPD kialakulásában.

A női nem, is rizikótényező, mert nőknél hamarabb alakul ki a légzésfunkció romlása, mint férfiaknál, és az további vizsgálatokat igényel. A nőknek nagyobb a kockázata a COPD kialakulására, mint a férfiaknak, mert a nagyobb az esély nők esetén atópiás megbetegedések kialakulására, a bronchiális hyperreaktivitásra. (26,27,28,29,30,31).

Nagyon fontos tényező a prenatalis dohányzás, a dohányos nőnek kisebb súlyú, fejletlenebb gyermeke születik, és ez önmagában növeli az alsó légúti megbetegedések kockázatát a születés után. A COPD kialakulásában rizikótényező lehet az alacsony születési súly, valószínűleg azért, mert ezek a koraszülött egyének légzésfunkciója elmarad a fejlettebben születettektől, arról nem is beszélve, hogy a koraszülöttség egyik fő kockázata, a tüdőszövődmény. A gyermekkorban levő passzív dohányzás szintén növeli az alsó légúti infekciók kialakulását és a posztnatális korban passzív dohányzásnak kitett gyermeknek 5%-kal kisebb lesz a maximálisan elérhető FEV₁ értéke. A fiatalabb korban kezdődő, gyakran súlyos COPD-s esetek hátterében, a gyermekkorban elkezdett dohányzást, a passzív dohányzást, a prenatalis dohányzást, a koraszülöttséget és a gyermekkorban elszenvedett számos infekciókat jelölik meg okként (32,33,34,35).

Nem egyértelmű, hogy miért, de igen erőteljesen látható az összefüggés a betegek szociális helyzete és a COPD kialakulása között. Hasonló a helyzet a TBC és a HIV fertőzés esetén is, rizikó tényező a COPD kialakulására, de az etiológiai kapcsolatot nem tudjuk pontosan meghatározni (36,37,38).

2.2. A COPD KLINIKUMA

2.2.1. A COPD definíciója, klinikai képe, és stádiumbeosztása

A COPD progresszív légúti áramláskorlátozottsággal, légúti obstrukcióval, jellemezhető, mely folyamat progresszív és irreverzibilis. A funkciózavar oka a mai feltételezések szerint a tüdő kóros gyulladásos reakciójával magyarázható, amelyet káros részecskék, gázok, és füst belégzése okoz. A kórfolyamat mind a légutakat, mind a tüdőparenchimát károsítja, és a két terület érintettségének aránya betegenként különböző lehet. A COPD eredeti definíciója szerint sem egységes kórkép: két fő komponense a krónikus bronchitis és/vagy emfizéma. Lényegesen ritkábban látjuk élesen elkülönítve az emfizéma és az idült hörghurut klinikai képét, mint ahogy azt a korábbiakban gondoltuk, tüneteik és légzésfunkciós jellegzetes eltéréseik a betegek jelentős részében „összekeverednek” és egyszerre felismerhetőek, amit a mindennapi klinikai gyakorlatban is látunk (39)

Krónikus bronchitisről definíció szerint akkor beszélünk, ha a beteg legalább három hónapon át köhög, és köpetet ürít. Ezek az előbb említett panaszai két egymást követő évben ismétlődnek és emellett nem áll fenn más olyan betegség, amely ezeket a tüneteket magyarázza (WHO 1959. definíciója, ma is ez az elfogadott) (40). Charles Badham 1808-ban ismerte fel a betegség két vezető tünetét, a krónikus köhögést és a tüdő fokozott nyáktermelését. Ha elsősorban a nagylégutak érintettek, akkor a köpettermelés és a köhögés fokozódása a jellemző tünet, míg a kislégutak érintettsége esetén a légúti obstrukció dominál a légzésfunkciós vizsgálatnál, és a beteg erős fulladásról panaszlik.

A klasszikus definíció szerint az emfizéma a bronchiolus terminálistól distálisan fekvő légterek kóros kitágulásával is járó megbetegedés, melyet az alveolusfalak destrukciója kísér, és amelynek következtében hatalmas emfizémás bullák jönnek létre, de nyilvánvaló fibrózis a tüdő parenchymában nincs. A tüdőtágulás első hiteles leírása a XVII. század végéről származik, ami nagy kiterjedésű tüdőről számol be. Egy évszázaddal később Morgagni 19 olyan esetről ír, amikor a tüdő "duzzadt" volt (41). A légzésfunkciós paraméterek közül a statikus volumenek mutatnak kóros értékeket. A légterek kitágulásával egyre csökken a légző felület, ami a tüdő rugalmasságának beszűkülésével jelentős légzésfunkció-romláshoz vezet. A folyamat progresszív és irreverzibilis.

Jelentős mérföldkövet jelentett a krónikus bronchitis és a tüdőtágulás történetében az 1950-es évek vége, amikor a két összetevőből kialakuló betegséget COPD néven először Briscoe és munkatársai említették, és 1965 óta ez vált általánosan elfogadottá (42,43). Azóta a betegség definíciója, egészen a mai napig sok változáson esett át, és sok tekintetben a mai napig sem lezárt ez a kérdés.

A betegség diagnosztikája egyszerű, gyakran „blick diagnózis”. Akkor mondhatjuk ki a COPD diagnózisát, ha a beteg köhög, köpetet ürít, és/vagy terhelésre fullad, és légzésfunkciós vizsgálattal obstruktív ventilációs zavart észlelünk. A COPD diagnózisának kimondásához elengedhetetlen a bronchodilatátor terápia után észlelt, irreverzibilis obstrukció igazolása (44). A COPD stádium beosztása a FEV₁ (erőltetett kilégzési első másodperc térfogat) és a Tiffeneau-index (FEV₁/VC_{max}) alapján történik (2.1. táblázat). Ma már tudjuk azt is, hogy a COPD súlyosságának, és a COPD kezelésének a lemerésére nem ez a legérzékenyebb módszer. A legszenzitívebb légzésfunkciós paraméter meghatározására még nem született egyértelmű megegyezés. Azt látjuk, hogy igen különböző klinikai állapotú, klinikai megjelenésű betegek gyakran kerülnek azonos COPD súlyossági stádiumokba besorolásra a FEV₁ érték alapján (2.1 táblázat) (45,46,47,48). Mindezek ellenére a

légzésfunkciós eredmények a klinikai diagnózishoz továbbra is elengedhetetlenek. Munkánk során a COPD-s betegek légzésfunkciós eredményeit használtuk a korrelációs vizsgálatainkhoz mi is.

A betegség differenciál diagnosztikája az esetek többségében a pulmonológusok számára nem jelent nagy kihívást. Legnezebb megkülönböztetni a dohányzó asztmás beteget a COPD-stől, ez egy súlyossági ponton túl már lehetetlen is. Az asztma bronchiale mellett a dilatatív cardiomyopathia, TBC, a bronchiectasia, panbronchitis, és a bronchiolitis obliterans érdemelnek differenciál diagnosztikai szempontból említést.

A COPD akut exacerbációi alatt egy akut állapotromlást értünk, amelynek során a betegnek romlanak a légzőszervi tünetei és ezek a romlások, meghaladják a betegek napi ingadozó állapotváltozásainak a mértékét. Az akut exacerbációk hátterében az esetek körülbelül 50%-ában infekciók állnak (49,50). Különböző súlyossági fokai lehetnek és a beteg állapotának függvényében alkalmazzuk a megfelelő kezeléseket. A COPD-s betegek tekintélyes részét akut exacerbációk következtében veszítjük el. Egy-egy súlyosabb exacerbáció után rendszeresen csökkennek a légzésfunkciós paraméterek, és többet nem térnek vissza az akut exacerbáció megelőző értékekre (51,52).

I. Enyhe	II. Középsúlyos	III. Súlyos	IV. Nagyon súlyos
FEV ₁ /FVC < 70%			
FEV ₁ >80 %	50 % < FEV ₁ < 80 %	30 % < FEV ₁ < 50 %	FEV ₁ < 30 %
Tünetekkel, vagy tünetek nélkül	Tünetekkel, vagy tünetek nélkül	Tünetekkel, vagy tünetek nélkül	Chr. resp. insuff., vagy jobb kamra elégtelenség
Az egyes súlyossági lépcsőkhöz tartozó ajánlott kezelések			
Dohányzásról történő leszokás			
Rizikó tényező kerülése, influenza vakcináció			
Szükség esetén rövid hatású béta agonista, anticholinerg szerek			
	Egy vagy több hosszú hatású bronchodilatátor, hosszú hatású béta agonisták, hosszú hatású anticholinerg szer, theophyllin rehabilitáció		
			Inhalációs kortikoszteroid ismétlődő akut exacerbációkkal
			Házi oxigénkezelés resp. insuff. esetén, vagy sebészi kezelés

2.1 táblázat: A stabil COPD stádium beosztása, és az egyes stádiumokhoz javasolt kezelések a GOLD protokoll alapján. A GOLD beosztás 2005-2010 között nem változott, korábban szerepelt benne a „0” stádium, (élettani légzésfunkció mellett évek óta fennálló klinikai tünetek) amely csoport, mind klinikailag, mind kutatási targetként a legizgalmasabb csoport volt (⁵³).

Az amerikai és az európai tüdőgyógyász társaság első alkalommal 1995-ben adott ki ajánlást a COPD kivizsgálásával és gyógykezelésével kapcsolatban (54,55). Ezt követően 1997-ben jelent meg az NIH (National Institute of Health) és WHO indíttatására a mai napig a legszélesebb körben elfogadott és alkalmazott GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) protokoll (1), amelyet évente megújítanak, éppen a COPD-vel kapcsolatos extenzíven növekvő ismeretanyag miatt. A értekezésemben a GOLD klasszifikációját használom; mert ez a protokoll terjedt el a legszélesebb körben az irodalomban, és a megjelent közleményeinkben is ennek a beosztásnak alapján osztályoztuk

a betegeket. Jelenleg a 2010-es verziót idézem (2.1 táblázat).

A GOLD 2011-es változata (2011. decemberében jelent meg) alapvetően átalakította COPD beosztását, mert változatlanul megmaradt FEV₁ értéken alapuló súlyossági besorolás, de mellette a klinikai tünetek és az akut exacerbáció rizikója alapján a betegeket különböző típusokba sorolta. A betegeket másik szempontként az irodalomban, széles körben elfogadott mMRC (Modified Medical Research Council Questionnaire) és a CAT (COPD Assessment Test) (56) kérdőív alapján osztályozza. Ezek a kérdőívek a COPD-s betegek fulladásának megítélésére alkalmas gyorsan alkalmazható tesztek, amelyek alapján a fulladás mértéke számszerűen és longitudinálisan összehasonlítható. Emellett a beteg életminősége és várható életkilátásait alapvetően meghatározó évenként jelentkező akut exacerbációk számát is figyelembe veszi a csoportok kialakításánál (2.2 táblázat). A 2011. decemberében megjelent GOLD besorolását nem kívánom ettől részletesebben ismertetni, mivel a disszertációhoz felhasznált közleményeim nem ennek alapján osztályozták a betegeket, valamint a pár hete publikált beosztás pontos értékének, felhasználhatóságának, és napi alkalmazhatóságának a felmérésére az eltelt idő rendkívül csekély. Az új COPD súlyossági beosztása mellett biztosan nem sokat fog veszíteni klinikai jelentőségéből a légzésfunkció vizsgálata, és tartósan az egyik markere lesz a COPD súlyossági mutatóinak továbbra is.

A betegek többsége dohányzik. A COPD kialakulásának valószínűsége és a betegség súlyossága az elszívott cigaretták számával mutat összefüggést (57). A dohányzás mértékének a meghatározására és összehasonlítására használjuk a csomagév fogalmat (pack-year, PY).

PY= (naponta elszívott cigaretták száma/20) x a dohányzással töltött évek száma.

(Nota bene: ma a cigarettás dobozok többségében 19 szál cigaretta van, de a definíció még nem követte a piac változását.)

Légúti áramláskorlátozottság GOLD stádium FEV ₁ alapján	4	C	D	évi ≥ 2
	3			
	2	A	B	évi 1
	1			
		mMRC 0-1	mMRC ≥ 2	
		CAT<10	CAT≥ 10	
		Az akut exacerbációk kockázata		

2.2 táblázat: a 2011-es GOLD a COPD stádium besorolásnál a beteg életminősége és várható életkilátásait alapvetően meghatározó évenként jelentkező akut exacerbációk számát is figyelembe veszi a FEV₁ értékek mellett. A csoportba sorolásnál a beteg életminőségi mutatói (CAT, mMRC score) is meghatározó jelentőségűek.

2.2.2. A COPD szisztémás betegség

Ismereteink alapján úgy foglalkunk állást, hogy a COPD egy sokszínű, összetett klinikai szindróma, amelynek legjobban mérhető eltérései a tüdőben zajlanak, és legegyszerűbb módon ezek az eltérések légzésfunkciós vizsgálatokkal mérhetők. Tekintettel arra, hogy a COPD a középkorú, vagy idősebb és leggyakrabban akár évtizedek óta dohányzó emberek megbetegedése, ezért ritkán látjuk a COPD tüneteit önmagukban, hanem mellette számos más megbetegedést is észlelünk. A COPD kórfolyamatai azonban nem csak a tüdőben zajlanak, hanem komoly szisztémás hatásokkal is számolni kell. A

szisztémás hatásokért a keringésbe került gyulladásos mediátorok egész sora, mint például a $\text{TNF}\alpha$, szabad gyökök, és IL-6 felelősek, de a dohányzásnak egész szervezetet károsító hatása is fontos.

Az extrapulmonális hatások tovább súlyosbíthatják a kórképet, ezek közül a legjelentősebbek a cachexia, súlyos osteoporosis, gastroesophagealis reflux, depresszió, cardiovascularis megbetegedések, szívinfarktus, diabetes mellitus, glaukóma, amelyek feltétlenül kiemelendők (58). Ezek közül a fogyás, az izmok disszfunkciója érdemel elsősorban említést és ehhez gyakran társul a csökkent terhelhetőség is (59,60). Biztosan tudjuk, hogy ezek a megbetegedések részben a COPD szisztémás hatásával magyarázhatók, másrészt az öregedés és a dohányzás más szervrendszereket is érintő hatásai felelősek a tünetek létrejöttéért.

A COPD-s betegeknél a kardiovaszkuláris megbetegedések, a metabolikus szindróma, osteoporosis, diabetes, infekciók és a depresszió is a COPD szisztémás hatásaival magyarázható (61). A COPD-s betegnek akár hetvenszeres is lehet a kockázata a hörgőrák kialakulására (62,63). Arról pontos adatainak nincsenek, illetve a folyamatok egyelőre egyértelműen nem tisztázottak, hogy a COPD-s betegeknél a tüdőrák lényegesen nagyobb arányú előfordulása a közös etiológiával magyarázható-e (dohányzás) vagy a COPD, illetve a tüdőrák kialakulásáért felelős gének, esetleg azonos gének játszanak meghatározó szerepet? A szisztémás hatások meghatározzák, és alapvetően befolyásolják a betegek életminőségét, életkilátásait, és várható túlélését is (64,65,66,67,68,69,70).

2.2.3. A COPD kezelése

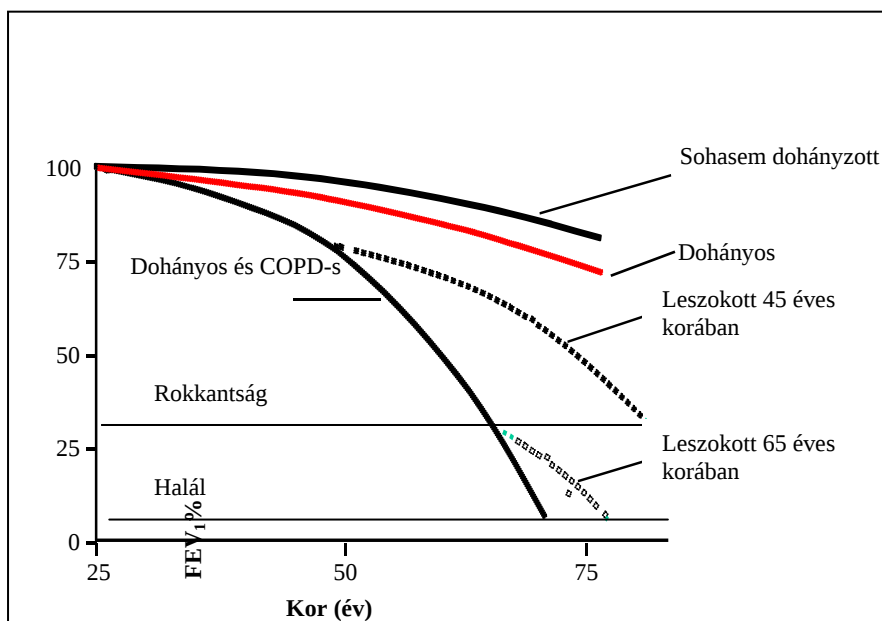
Jelenleg a COPD kezelését világszerte a GOLD protokoll ajánlása alapján végezzük. A GOLD mellett nemzeti és nemzetközi tüdőgyógyász társaságok útmutatói is megjelentek, és az elmúlt évek során több alkalommal módosításra kerültek (71,72). A 2011. decemberében megjelent GOLD nemcsak a COPD-ben szenvedő betegeket sorolta be különböző csoportokba, hanem megváltoztatta a 2.1 ábrán bemutatott kezelési elveket is. Ezeket az új elveket sem kívánom részletesen ismertetni.

Három evidencia markánsan meghatározza a COPD kezelését: 1. Jelenleg nem ismerünk olyan gyógyszert, amely képes lenne csökkenteni a COPD-ben szenvedő betegek hosszú távú légzés funkció vesztését és biztosítani a beteg gyógyulását! 2. Csak a dohányzásról történő leszokás képes hosszú távon mérsékelni a beteg FEV_1 értékének az esését. 3. Csak a tartós házi oxigénkezelésről bizonyított, hogy egyértelműen növeli a COPD-s beteg túlélését.

Több mint 30 évvel ezelőtt publikálták a Peto-Fletcher ábrát. Azóta számos kezelési próbálkozás történt, de változatlanul nem ismerünk olyan gyógyszert, amely képes lenne a dohányos betegek légzés funkció romlásának ütemét megváltoztatni (73) (2.3 ábra). Az alkalmazott gyógyszerek a betegség progresszív jellegét nem befolyásolják, és ennek megfelelően a vizsgálatok azt igazolták, hogy az alkalmazott gyógyszerek nem vagy alig befolyásolják a betegek hosszú távú túlélését. Nem rendelkezünk olyan hatékony gyógyszerrel, amely oki kezelést jelentene, akár a krónikus bronchitis, akár az emfizéma kórfolyamatában és a betegek folyamatos állapotromlását megakadályozná vagy a várható életkilátásait növelné. A gyógyszeres kezelés elsődleges célja a tünetek, az exacerbációk és a szövődmények csökkentése.

A COPD kezelésében elsődleges a rizikó tényezők csökkentése. Jelen tudásunk szerint csak a dohányzásról történő leszokás képes hosszú távon mérsékelni a beteg FEV_1 értékének az esését (lásd a Peto-Fletcher görbét) és csökkenteni a progresszív a légúti áramlási korlátozottság csökkenését (73). A

stabil COPD kezelésében számos tényező játszik meghatározó szerepet, a kezelés lépései egymást követik, egymásra épülnek és az ajánlott kezelés a betegség súlyosságától függ, az ajánlott kezelések a COPD stádium beosztására alapulnak (74). A stabil COPD klinikai súlyosság szerint ajánlott kezelési rendjét a GOLD protokoll ajánlása alapján 2.1. táblázat tartalmazza.



2.3. ábra Peto-Fletcher grafikon. 25 éves kor felett minden ember évente 10-15 ml-t „veszít” a FEV₁ értékéből. Dohányosok esetén, akik „érzékenyek” cigarettafüstre, COPD-sek, ez akár évi 75 ml is lehet. Ha valaki leszokik a dohányzásról a FEV₁ vesztes aránya a nem dohányzókéhoz, tolódik el. A COPD-ben szenvedő felnőtt betegnél, ha a FEV₁ > 1,5 l, a várható túlélés > 10 év, ha a FEV₁ = 1,0 l, akkor a várható túlélés = 4-5 év, ha a FEV₁ < 0,5 l a várható túlélés < 2 év.

A hörgőtágítók között a β_2 receptor agonisták a sima izomsejtek, légúti epitheliális sejtek, hízósejtek, endotheliális sejtek sejtmembránjában található β_2 receptorokon hatnak. A glükokortikoidok orális és parenterális alkalmazása elsősorban az akut exacerbációk idején indokolt. Az inhalációs szteroidok kevésbé hatékonyak, COPD-ben mint asztmában. A hosszú hatású β_2 agonisták és az inhalációs kortikoszteroidok kombinált készítményként való alkalmazása hatékonyabb, mint az alkotó szerek önmagukban. A szinergista magyarázat szerint a glükokortikoidok „up regulálják” a β receptorokat, a béta agonisták foszforilációt indukálnak a glükokortikoid receptorokon, így egymás hatását erősítik (75). Az anticholinerg szerek lokálisan alkalmazva hatásos bronchodilatátorok és a legfontosabb hatásuk az acetilkolin átvitel blokkolása az M3 receptorokon (76, 77). A legrégebben használt hörgőtágítók, a metilxantinok, nem szelektív foszfodiészteráz gátlók (78). Alapvetően a légző izmok funkcióját befolyásolják, és gyulladásgátló hatásuk is van. A theophyllin metabolizmusát számos tényező és az alkalmazott gyógyszerek jelentősen befolyásolják, ezért a szer dózisát egyénileg kell beállítani (79).

Válogatott esetekben mellkas sebészeti kezelés is szóba jöhet COPD-s betegek kezelése során, ezek közül bullectomiát és a volumenredukciós műtet érdemes megemlíteni (80). Ezeknek a műtéteknek a tervezésénél számolni kell a tekintélyes műtéti kockázattal, úgy, hogy a hosszú távú klinikai eredmények messze elmaradnak a várttól. A gyógyszeres kezelés mellett, végstádiumú COPD esetén, nem dohányzó betegeknél a tüdőtranszplantáció is elfogadott kezelési módja a betegségnek

(81, 82, 83, 84). A COPD-s betegek mellkas-sebészeti kezelése során gondolni kell a későbbi tüdőtranszplantáció lehetőségére is, és a mellkasebészeti, műtét végzésénél ezt a későbbi lehetőséget is figyelembe kell venni.

Mivel nem ismerünk olyan gyógyszert, amely képes lenne COPD-s gyulladást csökkenteni, így nem vagyunk képesek a betegek túlélési mutatóin sem javítani a szokásos pulmonológiai gyógyszerekkel. A COPD poliszisztémás megbetegedés, így a betegek kísérő betegségeinek a hatékony kezelése talán képes javítani a COPD-s beteg túlélését. (2.2.3 fejezet) Jelenleg klinikai gyógyszer vizsgálatok zajlanak például, COPD-s betegeknek adott bétablokkolókkal vagy sztatinokkal, abban a reményben is, hogy talán a szisztémás komponensek kezelése esetleg javítja a COPD mortalitási mutatóit (85,86).

2.2.3 .1. A jövő terápiás lehetőségei

A klinikai gyógyszervizsgálatok, amelyek IL-8 és a TNF- α antagonizálására irányultak, nem mutattak klinikai előnyöket (87,88). A P-38 kináz inhibitor úgy tűnik, hogy centrális szerepet játszik számos gyulladásos folyamatban. Ennek a gyógyszer családnak a tagja a Roflumilast is, amely Magyarországon törzskönyvezés alatt áll (89,90). A tachikinin, a substance P és a neurokinin jelen vannak a humán légutakban. A tachikinin receptor antagonistákkal az eredmények a nagy preklinikai adathalmaz ellenére mai napig csalódást okoznak (91). A tüdő repair fokozása egy reális cél, pl retinol-savval, amelyik stimulálja az alveolus fal növekedését, klinikai gyógyszervizsgálatok transzretinol-savval átütő eredményt nem adtak (92,93,94). Számos gyógyszervizsgálat zajlik a fent említetteken kívül, de gyógyszerfejlesztésben az igazi siker még várat magára (95,).

2.3. A COPD PATOMECHANIZMUSA

A COPD patogenezisével kapcsolatban számos mozaikszerű ismerettel rendelkezünk ma (96).

2.3.1. Cigaretta füst és gyulladás

A COPD etiológiájában számos tényező dokumentáltan szerepet játszik, mint pl. környezeti tényezők, lakáson belüli emelkedett légszennyezettség (indoor air pollution), a munkahelyi környezettel összefüggő szennyező tényezők, gőzök, gázok és munkahelyei porok. A COPD-ben szenvedő betegek többsége dohányzik és a dohányosok környezetében elszennvedett passzív dohányzás is komoly aetiológiai tényező. A dohányfüst több mint 6 000 különböző alkotóból áll, és a legfontosabb oki tényező a COPD etiológiájában. A COPD kialakulásának valószínűsége és a betegség súlyossága az elszívott cigaretták számával mutat összefüggést. A füst krónikus gyulladásos folyamat elindítója és a proteáz-antiproteáz, egyensúlyának a felbomlásáért is felelős, valamint az oxidatív stressz révén gyulladásos folyamatokat generál. A dohányzás abbahagyása után lassul a progresszív légzésfunkció vesztés (2.3. ábra). A gyulladásos folyamatok a légutak átépülését, (remodelingjét) okozhatják (97).

2.3.2. Genetikai és génkifejeződési tényezők szerepe a COPD kialakulásában

Nem kétséges, hogy a dohányzás a legfontosabb rizikótényező a COPD kialakulásában, de számos egyéni variáció is ismert. A különböző személyeknek különböző az érzékenysége a károsító tényezőkkel, a dohányzással szemben. A dohányzás mellett számos egyéb külső tényező is, mint oki tényező szerepel a COPD kialakulásában, (mint pl. légszennyezés, fűtés, foglalkozási ártalmak stb.), de

ezek pontos szerepe csak nemdohányzó populációban vizsgálható, és jelentősége messze elmarad a dohányzásétól. Mindezen adatok ellenére, a tényleges egyéni érzékenység, genetikai háttér még egyértelműen nem bizonyított, és valószínű, hogy mind a genetikai, mind a környezeti tényezők szerepet játszanak a betegség kialakulásában (98). Széleskörű meta-analízisek során a dohányzás a populációban 60-80% kockázattal bír a COPD kialakulását illetően. Számos vizsgálatban ez az arány kevéssel 80% alatt volt a nyugati populációban (99,100). Ebben az összefüggésben számos genetikai tényezőről feltételezik, hogy a COPD kialakulásában fontos tényező. Ez annak a lehetőségét is felveti, hogy a gyulladásos folyamatok egyénileg heterogén módon zajlanak és ez a heterogenitás nyilvánul meg a dohányzással és más környezeti károsító tényezőkkel szembeni érzékenységben is. Megszámlálhatatlan vizsgálat zajlott, azért, hogy feltárják a gyulladásos folyamatokban szerepet játszó genetikai tényezőket. A COPD kialakulásának hátterében poligénes öröklésmenet áll. Az elmúlt évek során számos gén polimorfizmusról bebizonyosodott, hogy hozzájárul a COPD kialakulásához. A genom számos régiójában, így 14-es kromoszóma számos régiójában 2q kromoszóma régióban közöltek genetikai asszociációt (101,102)(2.4. táblázat).

Saját vizsgálataink során 2001-ben bronchoalveoláris lavage-ban (BAL) található alveoláris makrofágokból végeztünk RNS cluster analízist (*nem publikált adat*). Ennek alapján a dohányos egyén és a COPD-ben szenvedő beteg az génkifejeződés mintázata alapján megkülönböztethető (2.5. ábra). A COPD kombinált (krónikus bronchitis + emfizéma) esetei, a tisztán krónikus bronchitisben, vagy emfizémában szenvedő beteg RNS klustere különböző és különbözik a korábban a dohányzásról leszokott egyén alveoláris makrofágjainak RNS mintázatától. Globális gén expressziós analízissel olyan gének csoportját azonosítottuk, amely specifikus COPD-re és mind az alveoláris makrofágokban, mind a perifériás vérben található monocitákban expresszálódik, és korrelációt mutat a betegség súlyosságával, az az a FEV₁-el (103).

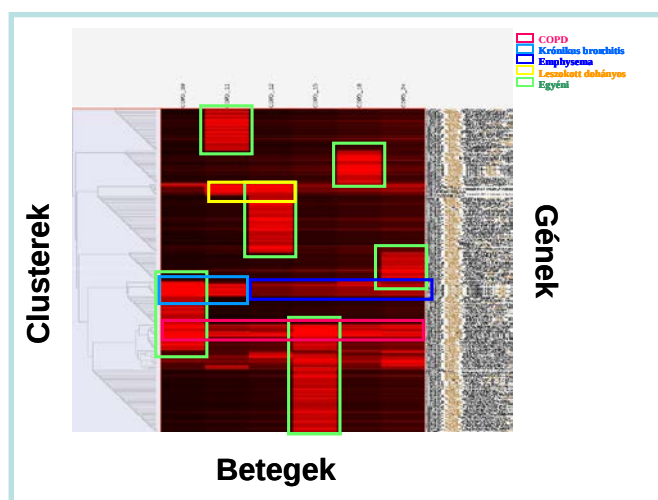
Genetikai tényezők szerepe a COPD-ben		
ACE	IL6	SOD3
ADRBZ	LTA	TGBB1
EPHX1	MMP9	TIMP2
GSTP	SERPINA3	TVF
IL13	TLR4	GSTM1
IL1B	ADA33	GSTT
IL4	ADRB2	TNF

2.4. táblázat: A COPD kialakulásában igazoltan szerepet játszó legfontosabb gének (¹⁰⁴⁻¹⁰⁵).

2.3.2.1. Alfa-1 antitripszin hiány

A genetikai vizsgálatok a legtöbb adatot az alfa-1 antitripszinről (A1AT) tártak fel, ismert, hogy hiánya súlyos, fatális veleszületett megbetegedést okoz. Az A1AT a vérben keringő szerin-proteáz-inhibitor, amelynek csökkent szintje vagy hiánya a proteolitikus enzimek (elasztáz, proteáz) aktiválódását eredményezi. A proteázok szövetdestrukciót okoznak, lebontják az interalveoláris szeptumokat, és a tüdő elasztin állományát így hoznak létre emfizémát. Az A1AT hiány miatt kialakult betegség azonban súlyos, gyors progressziójú, rossz prognózisú. Az emfizémás megbetegedéseknek mindössze 1-2%-a vezethető vissza A1AT hiányra. Magyarországon a súlyos máj- vagy tüdőbetegséget okozó PiZZ homozigóta állapot várható előfordulása 1:10 526, míg a PiSS homozigótáé 1:6060. (106). A súlyos betegek 25%-a 12 éves koráig, másik 25%-a 20 éves koráig meghal (107). A következő 25% enyhe májbetegség tüneteit mutatja, és a maradék 25% pedig akár tünetmentes is lehet, vagy az emfizéma tünetei miatt áll kezelés alatt. A betegek dohányzása miatt, további aetiológiai tényezőket rendszeresen

nem keresünk, így a genetikai eltérés sem kerül felismerésre ezért a mindennapi felnőtt tüdőgyógyászati gyakorlatban jelentősége elhanyagolható (106,107).



2.5. ábra: Globális gén expressziós analízis (Affymetrix platform) Hat beteg és hat kontrol egyén BAL makrofágjaiból izolált mRNS-t analizáltunk. A kísérlet egy nagyobb vizsgálat sorozat előkísérlete volt. A kísérletben arra kerestünk választ, hogy vajon találunk-e a BAL makrofágok gén kifejeződési mintázatában COPD-re illetőleg a COPD egyes típusaira (krónikus bronchitisz, emfizéma) jellemző mintázatot, és a dohányzásról való leszokásra van-e jellemző gén kifejeződési mintázat. Az analízis során, úgynevezett irányított klaszter vizsgálatot végeztünk, ami a minimum 1.5x-re megemelkedett génkifejeződést analizálta az egyes csoportokban. Érdekes, hogy mind a COPD-re (vörös négyyszög), mind a COPD egyes típusaira (krónikus bronchitisz, világoskék, emfizéma sötétkék négyyszög) és a dohányzásról való leszokásra is találtunk specifikusnak látszó mintázatot (sárga négyyszög). A kísérletben talált géneket nem validáltuk, mert a specifikusnak látszó mintázat elemei számban kisebbek voltak, mint az egyénre specifikus minták elemei (zöld négyyszögek). Mindez azt sugallja, hogy a kísérlet egyedszáma a kritikus alatt volt. Mindennek ellenére a kísérlet kivitelezhetősége egyértelművé vált és az alap kérdés további vizsgálatára így nagyobb mintaszámon és jobban kontrolált kísérleteket tudunk tervezni, amit aztán közöltünk is).

2.3.3. Sejtes elemek aktivációja

A COPD-ben szenvedő betegek esetén emelkedett *neutrofil* számot találtak az indukált köpetükben az azonos dohányzási szokással bíró egészségesekhez viszonyítva és a neutrofil szám negatív korrelációt mutatott a FEV₁ értékkel (108). A neutrofilek tüdőben levő akkumulációja különösen a légúti korlátozottság fennállása esetén, korrelál az elszívott cigaretták mennyiségével. A neutrofil felhalmozás 12 órán belül megjelenik a dohányzás után a tüdőben, és jellemző a COPD-re (109,110,111). A neutrofilek tüdőbe történő vándorlásáért az IL-8, az LTB₄, és NCF (neutrofil kemotaktikus faktor) felelősek. A neutrofilok proteolitikus enzimeket termelnek, így részt vesznek az irreverzibilis obstrukció kialakításában a hörgők és a parenchyma átalakítása (remodellingje) révén. A neutrofilek számos proteáz szekréciója révén egyrészt fokozzák a submucosa mirigyeinek mucin szekrécióját, másrészt az alveoláris struktúra destrukcióját is elősegítik (112)(2.6. táblázat). A köpet makrofágok, fagociták fontos szerepet játszanak a fertőzésekkel szembeni védekezésben. A makrofágok cigaretta füst hatására aktiválódnak, számos gyulladásos mediátort szekretálnak, és irányítják a dohányzással összefüggő gyulladásos folyamatokat. A szekretált gyulladásos mediátorok magasabb koncentrációja dohányos COPD-s betegekben nemcsak a köpetben van jelen, hanem kimutathatóak BAL folyadékból, tüdőszövetből is. A makrofágok magasabb száma a tüdőben, a COPD-sekben és dohányosokban egyrészt a kemokinek és kemotaktikus faktorok hatására bekövetkező fokozott makrofág beáramlással magyarázhatóak, másrészt, pedig a makrofágok fokozott proliferációjával és túlélésével a tüdőben

(113) (2.6. táblázat).

BAL mosófolyadékban, bronchiális biopsziák biopótumában, és tüdőszövet minták esetén emelkedett számú CD8⁺ lymphocytát észlelünk, és úgy tűnik, hogy a CD8⁺ T-limfociták különböztetik meg a COPD-s betegeket az egészséges dohányosoktól (114). Fordított összefüggés található a lymphocyta szám és a FEV₁ érték között (115). Az indukált köpetben emelkedett számban észlelhető CD8⁺ lymphocyta, és így a CD4/CD8 arány csökkent ezzel is növelve a köpet cytotoxikus aktivitását (116). A COPD-s betegek perifériás légútjaiban, nagy számban vannak jelen CD8⁺ T sejtek, amelyek valószínűleg a gyulladásos folyamatokban vesznek részt (117). Az egyes típusú T lymphocytáknak meghatározó szerepe van a vírus infekciókra adott válaszreakciókban. A nagy számú CD8⁺ lymphocyta akkumulációja a tüdő parenchyma destrukciójához és az irreverzibilis légúti obstrukció kialakulásához vezethet. Emellett a T sejtek IFN γ -t expresszálnak, ami állatkísérletekben emfizéma kialakulását segítheti elő (118).

Autoimmun mechanizmusok szintén szerepet játszhatnak a COPD kialakulásában. A CD8⁺ limfociták jelenléte a tüdőknben is ezt támasztja alá. Emellett növekedett az elasztin fragmentumok által aktivált limfociták száma is, és ez akár érzékenyítheti az autoantigéneket a COPD-sekben (119,120,121). Az autoimmun mechanizmusok alátámasztására veleszületett immunfolyamatokat azonosítottak, amelyek felismerték a dohányzás hatására létrejövő szöveti károsodásokat is. (122) (2.6. táblázat). A közelmúltban publikáltak egy sohasem dohányzott populációban végzett vizsgálatok eredményeit. Megállapították, hogy ezek a betegek, zömében idős posztmenopauzális nők, akiknek előzetes anamnézisében szerv specifikus autoimmun betegség szerepel. Általában krónikus köhögésben szenvednek, normális légzésfunkciós paraméterekkel, majd hirtelen FEV₁ csökkenés és a COPD klinikai képe lép fel, hasonló patomechanizmus lehet, mint az autoimmun gyulladásos bélbetegségek esetén (123)

Eosinofil sejtek jelenléte a köpetben valószínűsíti, hogy a szteroid kezelés hatékony lehet. Ismert, mind az asthma, mind a COPD kezelése során az, hogyha sikerül a köpet eozinofilek számát csökkenteni, akkor jelentősen csökken az akut exacerbációk száma (⁴⁵). A légúti obstrukció és ennek a reverzibilitása jól korrelál a kilégzett levegő NO tartalmával. Azoknál a COPD-s betegeknél, akiknek a légzésfunkciós paramétereinek volt némi reverzibilitása, azoknál magasabb NO értéket mértek, mint akiknél nem lehetett reverzibilitást észlelni a légzésfunkció során (124,125,126). Valószínűleg a köpetben található neutrofilek az IL-8 termelésük révén az irreverzibilis obstrukcióért felelősek, míg a köpetben található eozinofilek a szteroid kezelés hatékonyságának a letéteményesei, és a számuk csökkentése javítja COPD-s betegek légzésfunkciós paramétereit (2.6 táblázat).

Az idült dohányfüst expozíció gátolja a hengerhám csillóinak mozgását, nyákmirigy hyperplasiához vezet (127). A dohányfüst, egyszeri expozíció után tüdőben levő fibroblastok proliferációját gátolja, többszöri expozíció pedig irreverzibilis öregedési folyamatokat indukál a sejtekben. Egyre növekszik a bizonyíték arra nézve, hogy a krónikus gyulladásos megbetegedések öregedési folyamatokat generálnak, és ebben az oxidatív stressz meghatározó szerepet játszik, ez különösen az emfizéma kialakulásában és progressziójában bír jelentőséggel (128,129,130). Ennek következtében a reparatív funkció is károsodik.

Gyulladásos sejtek COPD-ben	
Neutrofilok	A dohányosok köpetében nő a számuk
	Számuk összefügg a COPD súlyosságával
	Néhány neutrofil látható a tüdőszövetben is
	Fontos szerepet játszik a váladék hipersecrécióban, és a proteázok termelésében
Makrofágok	Nagyszámban látható a légutak lumenében, a tüdőparenchymában, és a BAL-ban
	A makrofágok a vérből kerülnek a tüdőbe, és ott differenciálódnak
	Dohányfüst hatására nagy mennyiségben termelnek gyulladásos mediátorokat, proteázokat COPD-s betegekben
	Dohányfüst hatására romlik a fagocitozisuk.
T limfociták	CD4 ⁺ , CD8 ⁺ sejtek emelkedett számban találhatóak a légutak falában, és a parenchymában
	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ növekedett
	CD8 ⁺ T sejtek (Tc1) és a Th1 sejtek IF γ -t termelnek, és CXCR3 expresszálnak
	Az alveoláris CD8 ⁺ sejtek cytotoxikusak, és fontos szerepet játszanak a légutak destrukciójában
B limfociták	A perifériás légutakban, és a limfoid folliculusokban nő a számuk, ami lehetséges, hogy a bakteriális kolonizációnak a következménye
Eozinofilek	A COPD-sek köpetében nő a számuk
	A légutakban, emelkedett számuk exacerbáció idején
Epitheliális sejtek	Cigaretta füst aktiválja, aminek hatására mediátorokat termelnek.

2.6. táblázat: Gyulladásos folyamatokért felelős sejtek, és jellemzőjük COPD-ben

2.3.4. Gyulladásos mediátorok és szöveti károsodás

A cigaretta füst a légutakat bélelő epitheliális sejtekkel, az alveolusokban található makrofágokkal kapcsolatba lépve számos kemokin, növekedési faktor transzkripcióját és szekrecióját is gerjeszti, és ezeken keresztül stimulálja a csontvelőt további gyulladásos sejtek termelésére. A gyulladásos sejtek kemotaktikus toborzása a tüdőbe az extracelluláris mátrixból képződött fehérjéken keresztül történik. A gyulladásos mediátorok neutrofileket, makrofágokat, monocitákat, limfocitákat toboroznak a tüdőbe, és az általuk termelt gyulladásos mediátorok a felelősek a szöveti károsodásért, és ennek önfenntartó folyamatért (2.7. táblázat). A széteső neutrofilekből és makrofágokból szabadgyökök, proteolitikus enzimek (elasztáz, kollagenáz) szabadulnak fel. Ezek a cigarettafüstben lévő szabadgyökökkel (oxidánsok) együtt megbontják a tüdő oxidáns-antioxidáns egyensúlyát és az alveolusfal pusztulását, a légző felszín beszűkülését, a tüdőszövet rugalmasságának csökkenését okozzák (131). A füst fokozza a proteolitikus enzimek kiszabadulását a leukocitákból és emellett a nervus vaguson keresztül a simaizom kontrakciót, okozza. Az eredeti elképzelés, amely szerint a neutrofil elasztáz a felelős a tüdőszövet destrukciójáért, az utóbbi időben tekintélyesen átalakult. A tüdőben a proteáz-antiproteáz enzimek egyensúlyának felborulása meghatározó az emfizéma patomechanizmusában. Bizonyított, hogy COPD-ben a kötőszövetben a proteázok mennyisége megnövekedett, míg a proteázok tevékenységét fékező antiproteázok koncentrációja lecsökken (132).

Az oxidatív stressz a folyamat öngerjesztésében játszik meghatározó szerepet, számos egyéb folyamatot, pl. gének aktiválódását, antiproteáz gének inaktiválódását is generálhatja, és fokozódása meghatározó szerepet játszik a COPD akut exacerbációjának kialakulásában. Az oxidatív stressz

következtében a hiszton-deaciláz aktivitása csökken COPD-s betegek tüdő parenchymájában, ami a gyulladásért felelős gének expressziójához vezethet, és ezzel párhuzamosan csökken a tüdő parenchymában a glükokortikoidok gyulladáscsökkentő hatása. Az oxidatív stressz markerei is természetesen kimutathatóak a perifériás vérből is, és ezeknek a koncentrációja a COPD akut exacerbációja idején szignifikánsan megemelkedik. A mediátorok közül az interleukin-8 (IL-8) igényel kitüntetett figyelmet, mivel termelését a dohányfüst belégzése indítja el, és a dohányos COPD-s betegek tüdejében igen magas koncentrációban vannak jelen (133).

Gyulladásos mediátorok COPD-ben	
Kemotaktikus faktork:	
Lipid mediátorok	LTB₄ : neutrofilekre, és T limfocitákra hat
Kemokinek	IL-8 : neutrofilekre, és monocitákra hat
Proinflammatorikus cytokinek:	TNFα, IL-1β, IL-6 : felerősítik a gyulladásos folyamatokat, és a szisztémás COPD tünetekért felelősek
Növekedési faktork:	TGFβ : a kislégutak fibrozisát indukálja

2.7. táblázat: A COPD patomechanizmusában szerepet játszó legfontosabb gyulladásos mediátorok.

2.3.5. Lipid mediátorok

Az irodalom a lipid mediátorok tekintetében igen kiterjedt és nem egyértelmű. A továbbiakban csak azokat a faktorokat emelem ki melyeket vizsgálataink céljára kiválasztottunk. A foszfolipázok metabolitjaiból kialakult lipid mediátorok fontos szerepet játszanak a COPD patogenezisében. Többek között lipid ligandok, arachidonsav metabolitok (prostaglandinok, protacyclinek, thromboxanok, leukotriének és az eicosatetraén sav), lysophospholipidek, zsírsavak és endocannabinoidok ligandjaként szerepelnek. Az arachidonsav metabolitok, speciális szerepet játszanak a COPD-ben gyulladásos folyamatokban. Ebből a csoportból a PgE₂, (prostaglandin E₂) PgD₂ (prostaglandin D₂) és az 5 és a 15-oxo-EETE (eicozanoid 5-oxo-6E, 8Z, 11Z, 14Z-eicosatetraén sav) különlegesen érdekes mediátor (134). A fenn említett metabolit család kitüntetett elemeit egyenként vizsgáltuk, alább az egyes kiválasztott mediátorokat egyenként bemutatjuk.

Prostaglandin D₂ (PgD₂): A PgD₂ az egyik legfontosabb membrán lipid-arachidonsav metabolitnak a PgD₂ a COX-1 és COX-2 enzimek indirekt és a proszttaglandin izomeráz enzimnek a közvetlen terméke. A PgD₂ szerepe az utóbbi néhány évben az asztma célpontok egyike lett. PgD₂ -t a hízósejtek és más gyulladásos, pl. dendritikus sejtek, vérlemezkék és T sejtek, granulocyták is termelik. Asztmában indukálja a bronchus simaizom összehúzódást a TP receptorokon keresztül és indirekt úton preszinaptikusan befolyásolva a cholinerg idegeket melyek a bronchus simaizomra hatnak. Az utóbbi években közölték, hogy a PgD₂ a DP1 és DP2 (kemoatraktáns receptor homolog) receptorokon keresztül hatva a bronchus szűkület indukcióján túlmenően fontos szerepet játszik a bronchoalveolaris tér gyulladásos infiltratumának kialakulásában. Ez különösen fontosnak látszik a DP2 receptoron keresztül kiváltott hatásra vonatkozóan, a DP2 receptor expresszálódik a Th2 sejteken az eozinofil és basophil granulocytákon is (135). Többek között az asztmás gyulladás kialakulásában játszott szerep miatt merült fel, hogy a COPD-ben is fontos szerepet játszhat a PgD₂.

Lysophosphatidylcholine (LPC): Az LPC egy proximális lipid mediátor precursor, ami a lipoprotein phosphatidylcholine phospholipase mediált bomlásterméke, egyrészt az endogén phospholipase A2 (PLA2), másrészt spontán reakció hozhatja létre (LPC1 és LPC2). Az LPC integráns része a sejtmembránnak és az oxidált lipoproteineknek is. Az LPC fontos szerepet játszik többek között az erek fejlődésében, a myelinizációban, a gyulladásos folyamatokban betöltött szerepe viszont nem egyértelmű. Több közlemény szerint a PAF-hoz hasonló „pro” gyulladásos hatása van. Ugyanakkor a közleményben kimutatták, hogy a tiszta PAF mentes készítmény gyulladásgátló hatású, pl. gátolja a granulocyták tüdőbe áramlását, amit egy ex-vivo tüdőperfúziós modellben igazoltak (136,137).

Eicosapentaen sav (EPA): Az Omega-3 telítetlen zsírsavak (n-3 PUFA) előnyös hatásai között a gyulladásban és a tumor növekedésben is gátló hatásai a legismertebbek. Sokan emiatt diétás szupplementumként is fogyasztják. A hagyományos gondolatmenet szerint a fenti gátló hatásokat annak tulajdonították, hogy gátolná az arachidonsavból származó prostaglandinok és leukotrienek keletkezését. Néhány éve viszont ismertté vált, hogy az n-3 PUFA-ból keletkeznek a gyulladásgátló endogén lipid mediátorok a resolvinok és a protectinek (138). Kémiaiilag ezek a vegyületek egyrészt hydroxilált származékai az n-3 PUFA eicosapentaen savnak (EPA) ezek az E-resolvinok, másrészt a docosahexaen savnak (DHA), ezek a D-resolvinok és a protectin D1. Diétás szupplementumként alkalmazva ismert, hogy az Omega-3 telítetlen zsírsavak jó hatással vannak a COPD-re (139). Első lépésként fontos volt megvizsgálni, hogy vajon detektálható-e az E-resolvinok prekurzora a bronchus mosófolyadékban, és hogy mutat-e korrelációt a COPD-re jellemző légzésfunkciós eltérésekkel.

15-Hydroxyeicosatetraen sav (15-HETE): A membrán phospholipidekből származik. Az EPA-nál és az LPC-nél distálisabban helyezkedik el a metabolikus úton. Lipidmediátor effector, ami a 15-lipoxygenáz terméke. A 15 lipoxygenáz indukálható módon fejeződik ki a tüdőben. Kimutatták, hogy a hypoxia indukálja a kis tüdőartériák 15-lipoxygenáz aktivitását, és indirekt úton aktiválja az enzimet. Ugyanakkor a hypoxia hatására az így felszabaduló 15-HETE vazokonstrikciót okoz, és a hypoxiás tüdő artériák érzékenyebben válaszolnak erre. (140,141). Ez a mechanizmus aktiválódik asztmában úgy, hogy a tüdőepithelium is termelni kezdi a 15 lipoxygenázt, és ez a kis bronchusok szűkületéhez is jelentősen hozzájárul. Érdekes, hogy asztmában a 15-HETE-ről kimutatták, hogy az IL4 indukálta szignáltranszdukciós utat is erősíti, úgy, hogy intracellulárisan aktiválja az IL4 szignál transzdukciós út proximális elemeit a Raf-1/MEK/ERK mechanizmuson keresztül. (142). Fontos megemlíteni, hogy a 15-HETE a PPAR γ ligandja (143). Csökkent 15 lipoxygenáz aktivitás alacsonyabb 15 HETE szintet eredményez és így csökken a PPAR γ aktivitás, amit a COPD-ben is gyakoribb nem kissejtes tüdőrák keletkezésével is kapcsolatba hoztak. (143). Egy korábbi közleményünkben (101) közöltük, hogy egyes PPAR γ polimorfizmusok, pl. a His447His ritka allélje szignifikáns asszociációt mutatott a COPD kimenetellel. Mindezt fontosnak tartottuk a 15-HETE vizsgálatát is.

2.3.6. Szöveti javító mechanizmusok, úgynevezett „repair” mechanizmusok

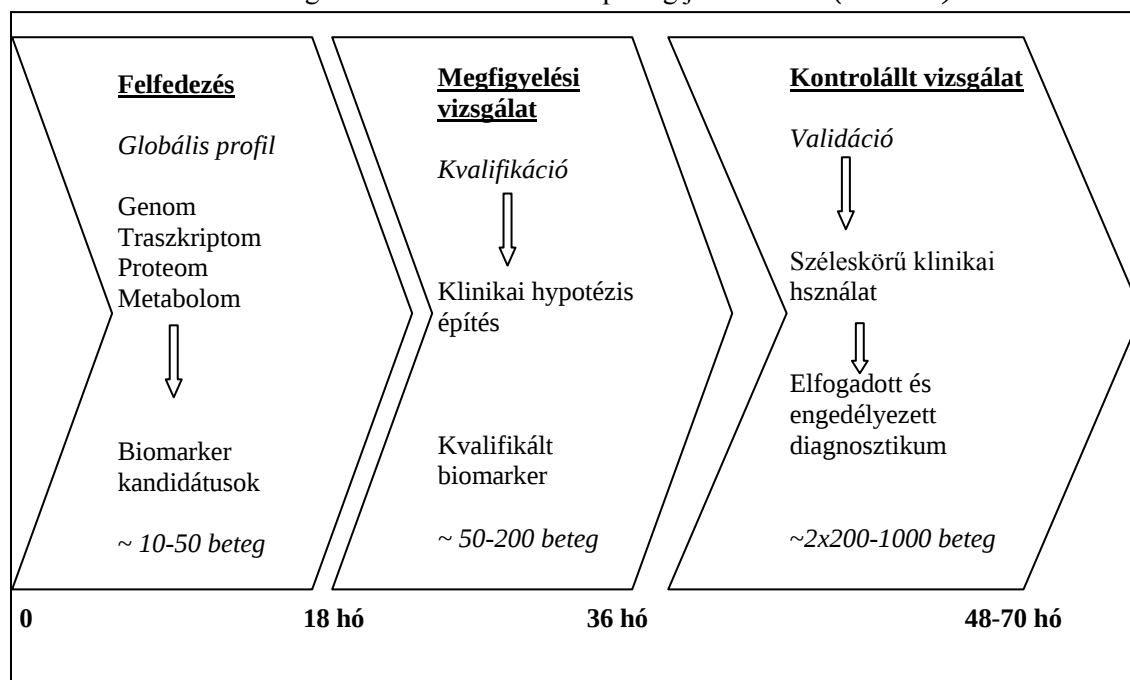
A dohányzás gátolja a „repair” vagy javító mechanizmusokat, mind az epiteliális sejtek, mind a fibroblastok szintjén. A parenchyma sejtek úgy tűnik, hogy abnormális javító funkcióval bírnak. COPD-s betegek tüdejéből vett, és tenyésztett fibroblastok lényegesen lassabban növekednek, kemotaktikus migrációra is kevésbé képesek, mint a kontrollok, és sokkal érzékenyebbek a dohányfüstre (144). A kollagén és az extracelluláris mátrix kontrakciója úgy tűnik, hogy COPD-s betegben csökkent, és csökkent az érzékenysége a TGF- β (transforming growth factor- β) iránt, ami általánosságban egyébként növeli a fibroblastok által biztosított javító funkciókat, és PgE (prostaglandin E) túl produkciójához vezet, amely szintén gátolja a fibroblastok által közvetített javító

mechanizmusokat (145). A cigaretta füst az idiopáthiás tüdőfibrozis kialakulásában is rizikótényező. A COPD és a vele szövődő tüdőfibrozis esetén az epiteliális sejtek TGF- β és fibronectin túl produkciója vezet a fibrotikus átalakuláshoz. A COPD-s betegekben származó fibroblastok szintén kisebb mértékben termelnek elasztint, és emellett még számos „repair mediátort”, mint például fibronectint, hepatocita és keratinocita növekedési faktort. Azt is bebizonyították, hogy a posztinatális időszakban és a gyermekkorban a passzív dohányzás a növekedési faktorok kaszkádja akadályokat állít, és későbbiekben az emfizéma kialakulását segítheti elő (146).

2.4 A BIOMARKEREK JELENTŐSÉGE

A biológiai, biokémia markerek, vagy biomarkerek a tudományos kutatás középpontjába kerültek az elmúlt évek során, éppen a remélhető klinikai alkalmazhatóságuk miatt. A biomarkerek olyan anyagok, amelyek különböző biológiai mintákban (szövet, vér, nyál, köpet, liquor stb) megtalálhatók, határozottan magasabb vagy alacsonyabb koncentrációban vannak jelen valamilyen betegség fennállása esetén. Ezeknek az anyagoknak a jelenléte vagy hiánya egyértelműen a betegség fennállására utal, és precízebben jellemzi a betegség jellegét, okát, mint az eddigi vizsgálatok. Bármilyen természetűek is a biomarkerek minden esetben utalniuk kell a betegségre, vagy a betegség jellegére, annak fennállására. Az azonosított biomarkerek klinikailag elég specifikusak és szenzitívek ahhoz, hogy az egészséges és a tünetmentes beteg között különbséget tegyenek. Ezért használhatók a biomarkerek gyógyszerkipróbálások során is, a szer terápiás hatékonyságának a monitorozására, esetleg a betegség diagnosztikájában, a betegség stádiumának meghatározására. A biomarkerek alkalmasak a patofiziológiai folyamatok specifikus molekuláris változásainak detektálására. Egyes esetekben, pl. a betegségre is jellegzetes proteinek, metabolitok stb. szintje növekszik, vagy csökken a szövetekben és az ezt jelző szérumban is. A biomarkerek a megváltozott fehérje, metabolit vagy génkifejeződés változására specifikusan utalnak, de legalább sejtetik a változásokat előidéző környezeti hatásokat, mint pl. dohányzást. A biomarkerek segíthetnek a biológiai vagy patológiai választ meghatározó egyedi DNS szekvenciák a biológiai szempontból fontos polimorfizmusok, vagy epigenetikai okok (pl. DNS metiláció), genetikai predetermináció szerepének a tisztázásában, illetve meghatározásában. Így a COPD betegség két fontos gyökere a környezet, és a gének hatása, a betegség stádiuma, a várható gyógyszeres válaszképesség és a kezelés kimenetele, vagy a tüdőrák jelentkezésének valószínűsége is jobb hatásfokkal lesz jósolható, mint ma. Az ideális diagnosztikus tesztek non invazív, vagy alig invazív módon végezhetők el vizelet, nyál, vagy vér vizsgálatával (147). A vizsgálathoz alkalmazott technikának egy-egy vizsgálatra nézve is olcsónak, könnyen hozzáférhetőnek, kivitelezhetőnek kell lenni, és a kapott eredményt egyszerűen kell interpretálni. A vizsgálati eredménynek minimalizálni kell a álpozitív és álnegatív eredményeket, igen szenzitívnek (>80%) és magasan specifikusnak (>95%) kell lenni. A kívánt érzékenységet a specificitást a biomarker validálás során méri meg, a követelmény az, hogy több száz betegen legalább két független vizsgálat eredményes legyen. Az ideális biomarkerek esetleg képesek a folyamat progressziójának, várható kimenetelének „jóslására”. A kísérleteknek feltétlenül ki kell terjedni a biomarkerek felfedezésére, a felfedezett biomarkerek validálására is, és meg kell határozni a validált biomarkerek klinikai értékét, alkalmazhatóságát, és helyét a betegségek diagnosztikájában és kezelésében is. A validáció alapfeltétele, hogy a megcélzott klinikai használatnak megfelelően jól karakterizált beteg és megfelelő kontroll csoporton történjen a vizsgálat. Az ilyen vizsgálatok előfeltétele a sikeres és úgynevezett megfigyelés szintű (observational study) vizsgálat, ami előkészíti, „kvalifikálja” a biomarkereket egy bizonyos alkalmazásra. Az új klinikai alkalmazásban meglevő értéket később a validálás során méri meg, a megfigyelési vizsgálatok alapján felállított

klinikai hipotézisekre épített jól karakterizált beteg kohorszok segítségével. Vizsgálatainkban a biomarkerek felfedezéséig és a kvalifikáció első lépéséig jutottunk el. (2.8 ábra).



2.8 ábra: A hipotézis nélküli biomarker felfedezés, kvalifikáció és validáció folyamata. A felfedezés fázisában célunk minél több potenciális markert detektálni, ehhez feltétlenül szükséges az egyes típusú markerek globális profilírozására használható technológia. A technológia általában költséges vagy komplikált, így viszonylag kevés betegből származnak az adatok. A kvalifikáció stádiumában néhány kiválasztott markert mérünk meg minél nagyobb, de nem speciálisan szelektált betegcsoportban. Itt a cél az, hogy a potenciális klinikai összefüggéseket felismerjük. A következő lépésben a kiválasztott potenciális klinikai alkalmazásokat célzottan teszteljük, speciálisan karakterizált betegcsoportokon és lehetőleg magas konfidencia szintet biztosító megfelelő kontroll csoportokat bevonva. A megadott betegszámok általános elveket tükröznek, gyakran a körülmények limitálják a lehetőségeket, így a statisztikusok által „előírt”, a kívánt statisztikai erőt biztosító számokat ritkán tudjuk elérni. Az itt bemutatott vizsgálatainkban a felfedezés „nyílban” jelzett stádiumig jutottunk a lipid biomarkerek terén, itt biológiai szempontból viszont kvalifikáltak a markerek. Célzottan olyan lipid mediátorokat választottunk melyek a COPD folyamatokban szereppel bírhatnak és a mintát is a patológiás folyamathoz anatómiailag közel eső helyről vettük. A fehérje markereket a módszer hatékonysága, a betegszám és a jól definiált kohors miatt előkvalifikálnak tekinthetjük.

Mostanáig a biomarkerek felfedezése gátolt volt, megfelelően, hatékony validálási folyamatok nélkül. A biomarkerek validálásának szűk keresztmetszete, az hogy a validálási folyamat általában nem jól tervezett, nehezen reprodukálható és nem elég szenzitív. Az onkológiában kiterjedten használják a különböző biomarkereket, az emlő, ovárium karcinóma mindennapos diagnosztikájában és kezelésében is évek óta alkalmazzák. Új biomarkerek felfedezése alkalmas lehet a malignus betegségek progressziójának a meghatározására is.

2.4.1. A pulmonológiai megbetegedések biomarkerei és azok forrásai, különös tekintettel a COPD biomarkereire

A légutak gyulladása fontos szerepet játszik különböző légzőszervi megbetegedések patogenezisében. Éppen ezért számos módszert dolgoztak ki a gyulladós folyamatok monitorozására. Invazív módszerek korlátozottan használhatók, mint pl. a bronchoalveoláris lavage, bronchiális biopszia, mivel a vizsgálat még limitáltan sem ismételhető. Nem invazív mód a vizelet, a perifériás vér, és a kilégzési kondenzátum vizsgálata. Az indukált köpet félig invazívnek tekintendő, de közelebb áll a noninvazív csoporthoz. A COPD igazolásának egyértelmű klinikai diagnosztikus markere a betegség tünetei mellett a FEV₁ csökkenés igazolása. Ez az egyetlen minden betegre alkalmazható, általánosan

elfogadott biomarker amit használhatunk a betegágy mellett – igaz a COPD II. stádiumától, és a korábbi „rizikó csoportra” (régén ez volt a 0 stádium) és az I. stádiumra nem alkalmazható. Jelenleg a kezelés hatékonyságának a lemerésére nem rendelkezünk egyértelmű klinikai biomarkerrel, erre a célra napjainkban csak az életminőségi mutatók javulását használják.

2.4.1.1. Az indukált köpet vizsgálata

Az indukált köpet vizsgálata az 1990-es években kezdődött (148). Az indukált köpet széles körben elfogadott vizsgáló módszer bronchoalveoláris tér vizsgálatára, és maga az indukált köpet, a bronchoalveoláris tér ujjlenyomatának tekinthető. Hypertoniás NaCl oldat belélegeztetésével a beteget fokozott légúti váladéktermelésre kényszerítjük. Asztma esetén diagnosztikus célból is végezzük. Az elmúlt időszakban rengeteg adat gyűlt össze a COPD-ben szenvedő dohányos és nem dohányos betegek indukált köpetének különbségeiről, amely jellemzők biomarkerként felhasználhatók (149,150). Különbséget találtak a sejtes összetevők és a szolúbilis fázis alkotói között is. Maga az indukált köpet elsősorban a nagylégutakban zajló folyamatokat reprezentálja, és nem ad információt a periférián, a kislégutakban zajló folyamatokról (151,152,153). Az indukált köpet folyékony fázisában mediátorok sorát mutatták ki, és igazolták szerepüket valamilyen módon a COPD patogenezisében (154,155,156) (2.9 ábra).

2.4.1.2. Kilégzett levegő kondenzátum

Az elmúlt évek kutatási eredményei azt jelzik, hogy a kilégzett levegő jól tükrözi a légutak felszínén zajló kémiai változásokat. Egy-egy betegségben a kilégzési kondenzátum az alveoláris és bronchiális tér ujjlenyomataként lehet jellegzetes az illető megbetegedésre (157,158). Kilégzési kondenzátum vizsgálata számos, elsősorban gyulladásos, interstitiális tüdőbetegségek, cystás fibrosis, és obstruktív tüdőbetegségben biomarkerek azonosítására lehet alkalmas. A kilégzési kondenzátum vizsgálata teljes mértékben non invazív, kockázat nélküli módszer, számtalanszor ismételhető, beteg ágy mellett is elvégezhető teszt, külön előnye, hogy gyermekek esetében is lehet alkalmazni. Számtalan mediátor, számos kémiai aktív vegyület, anyagcseretermék vizsgálható ezzel a módszerrel, mint pl., NO, CO, HCO₃, hydrogen peroxid, proteinek, prosztaglandinok, leukotriének, cytokinek stb (159,160,161) (2.9 ábra).

2.4.1.3. Perifériás vérben található biomarkerek

A perifériás vérben található markerek jelentőségének a vizsgálata során tekintettel kell lenni arra is, hogy egy-egy egyénben egymás mellett, párhuzamosan több betegség zajlik. Ezek kölcsönösen hatnak egymásra, és a különböző patofiziológiai folyamatok markerei megjelenhetnek a vérben. Ezért a perifériás vérből izolált biomarkerek jelentőségének az értékelése nagy körültekintést igényel (2.9 ábra). Dohányzás hatására gyulladásos markerek szabadulnak fel a keringő neutrofilekből. A perifériás vérben keringő mononukleáris sejtek COPD-sokban emelkedett kemotaktikus aktivitással bírnak, mint az egészséges dohányosokban, amelyet a mononukleáris sejtek CXCR2 fokozott expressziójával magyaráznak (162). A T sejtek fokozott mértékben termelnek TGFβ-t, TNFα-t is. Az oxidatív stressz markerei természetesen kimutathatóak a perifériás vérből is, és ezeknek a koncentrációja a COPD akut exacerbációja idején szignifikánsan megemelkedik. Emellett érdekes a plazma antioxidáns kapacitásának a trolox equivalens antioxidáns kapacitás (TEAC) vizsgálata is, amely mind egészséges dohányosokban, mind COPD-s dohányosokban csökkent (163). A CRP nagyon szenzitív, klinikai gyakorlatban jól használható marker, de a COPD akut exacerbáció miatt kórházba kerülő betegek kb. 50%-ának a CRP-je normál értékű (164,165). A CRP emelkedést inkább akkor látunk, ha a COPD akut exacerbációjának hátterében bakteriális ok áll. A szérumbiomarkerek meta-analízise során 652 biomarker vizsgálatot végeztek el, és azt találták, hogy a vizsgált biomarkerek nem mutatták a várt

összefüggést a FEV₁ alapú COPD stádium beosztással (166). Némi összefüggést találtak a CRP és a TNF α szint és a COPD súlyossági állapota között. (Nota bene a COPD FEV₁ alapú súlyossági beosztása biztosan tudjuk, hogy nem a legmegfelelőbb módszer a COPD klasszifikálására.)

2.4.1.4. Vizeletben található markerek

A vizelet vizsgálata egyszerű veszélytelen módszer. Ismert, hogy az emfizémás betegeknél károsodott az ellasztin-collagén egyensúly, aminek következtében a betegek vizeletében kollagén degradációs productumok jelennek meg, az emelkedett desmosin érték az ellasztin degradációja következtében jön létre, és a légzésfunkció gyors romlása kíséri (167) (2.9 ábra).

2.4.1.5. Bronchoalveoláris lavage és bronchiális biopszia

Az utóbbi időben a bronchoalveoláris lavage és bronchiális biopszia egyre elterjedtebbé válik a COPD-s betegek kivizsgálásában, és kutatási céllal is történnek vizsgálatok. Mind a BAL-ból, mind a bronchiális biopsziából számos sejtes, és gyulladásos mediátort, markert mutattak ki. Amellett, hogy a potenciális markerek egész sorát azonosították BAL-ból ennek ellenére nem rendelkezünk olyan markerrel, amely képes lenne a betegség biomarkereként szerepelni.

<i>Indukált köpet</i>	<i>Kilégzési kondenzátum</i>	<i>Perifériás vér</i>	<i>BAL és bronchiális biopszia</i>
Celluláris alkotó részek	CQ	Monocyta CXCR2	Alveoláris makrofágok
Neutrofilok	NO	Monocyta TBF- β	Neutrofilok
CD8+ lymphocyták	Pentán	Neutrofil apoptózis	CD8+ lymphocyták
Eosinofilok?	Ethan	T lymphocyta apoptózis	Eosinofil sejtek
Makrofágok	H ₂ O ₂	EDP	Apoptózis mediátorai
	8-isoprostan	Fibrinogén	Toll-like receptor TKR2, TLR4, CD14
Felülúszó	IL-6	CRP	Hisztón deacetiláz
MPO, HNL, ECP, IL-8	Nitrogén	Trolox equiivalent antioxidáns kapacitás	IL-6, IL-8, MPO, GRO α , Gluthation
LTB ₄ , GRO α , MCP-1	Nitrosothiol		Collagenáz 1, 2, MMP-1, MMP-8, gelatinaze A és B, MMP-2, MMP-9
GM-CSF, TNF α	LTB ₄	Neutrofil gyulladás	
NO	PGE-2		TGF β MMP szöveti inhibitorok (TIMP)
Köpet proteázok, MMP-1, MMP-9			Transcriptios faktor signáltranszdukcióhoz, transzkripcióaktivátor STAT
Köpet antiproteázok TIMP1			Thiol
			NF- κ B
			CXCL5, IL-8, CXCR receptor 1, 2

2.9 ábra: Összefoglaló táblázat a COPD legismertebb biomarkereiről(161, a 125-144-es referenciák alapján)

2.5 A COPD KUTATÁS KEZDETEI A DEBRECENI EGYETEMEN

A kísérleteket klinikai munkacsoportom és a Pfizer Fresnes Laboratory COPD munkacsoportja közötti kollaboráció indította el. A kollaboráció azért indult, mert a Pfizer-nél akkor (1999.) korai klinikai fejlesztés alatt álló foszfodieszteráz-4 gátló gyógyszer hatásának követésére alkalmazható klinikai tesztek felfedezése volt a cél (168). A Pfizer munkacsoportja sejtes, állatmodell kifejlesztésén is dolgozott. Emellett a DEOEC Tüdőgyógyászati klinika általam összegyűjtött COPD-s beteganyagán kívántak széleskörű „omikai” vizsgálatokat végezni azért, hogy gyógyszer-célpontokat találjanak, másrészt pedig, a COPD progresszióval kapcsolatos biomarkerek felfedezése volt a cél. A széleskörű molekuláris medicina irányultságú vizsgálat céljait, módszereit, valamint azt, hogy az egyes technológiák hogyan kapcsolódnak egymáshoz máshol már leírtuk (168).

Ezeknek a vizsgálatoknak lett a következő lépése a DEOEC területén a génkifejeződési, COPD génkapcsoltsági, proteomikai és metabolomikai vizsgálatok sora, azzal a hosszú távú céllal, hogy új többkomponensű marker-panelt találjunk a COPD betegség korai diagnózisára, és potenciális gyógyszer-célpontokat nevezzünk meg.

A: Első vizsgálatunkat 2001-ben elsősorban BAL-ból végeztük. Erre a **E. Csanky M.D, L. Nagy MD.Ph.D., P. Gergely Ph.D. DSc.**: *Identification of disease relevant target and biomarker candidate genes by comprehensive interrogation of the genome and proteome in COPD – 2001*, Pfizer grant biztosított anyagi forrást. A Pfizer kutatócsoportját Dr. Takács László M.D. Ph.D. DSc a Magyar Tudományos Akadémia külső tagja vezette: Klinikai munkacsoportom 41 betegnél végzett BAL vizsgálatot és ebből 39 betegnél vizsgáltuk a perifériás vérben található makrofágokat is. Globális gén expressziós analízissel olyan gének csoportját azonosítottuk, amely specifikus COPD-re és mind az alveoláris makrofágokban, mind a perifériás vérben található monocitákban expresszálódik, és korrelációt mutat a betegség súlyosságával, azaz a FEV₁-el (103).

B: Az eredmények biztatóak voltak, – így ennek talaján indult 2003-ban a COPD biomarker vizsgálat: **E. Csanky M.D, L. Nagy MD. Ph.D., P. B. Scholtz PhD, Gergely Ph. D.DSc.**: *Discovery and validation of biomarkers and drug targets for COPD: a clinical genomics, proteomics and genetics collaboration with the University of Debrecen-2003.* – **A9001156** – című Pfizer granttal. Pfizer kutatócsoportját Dr. Takács László M.D. Ph.D. DSc a Magyar Tudományos Akadémia külső tagja vezette.

A DEOEC tüdőgyógyászati klinikáján összesen 600 dohányos, COPD-ben szenvedő, illetve COPD-ben nem szenvedő beteget választottam be a vizsgálatba. A vizsgálat párhuzamosan öt ágon zajlott.

1. Genetikai, vizsgálat indult 250 dohányos COPD-s és 250 COPD-ben nem szenvedő dohányos perifériás vérből
2. A proteomikai vizsgálat során indukált köpet vizsgálat/vizeletvizsgálat zajlott, és a betegek perifériás vérből monoklonális antitesteket állítottunk elő – erről részletesen beszámolok ebben a disszertációban.
3. Tüdőrákban szenvedő betegekből eltávolított műtéti szövettani anyagából, a diagnosztikára nem kerülő szövet részleteken végeztünk expressziós vizsgálatokat.
4. Expressziós vizsgálatokat végeztünk bronchoalveoláris lavage-ból szeparált alveoláris makrofágokon (2.5 ábra).
5. Expressziós vizsgálatokat végeztünk perifériás vérből szeparált makrofágokon

Ebből a vizsgálatból korábban publikáltuk, azt hogy az EPHX1 gén 3 és 4 exonjának polimorfizmusa jellemző a magyar COPD-s populációra (Penyige Ph.D alapja). Először vizsgáltuk, a PPAR γ gén polimorfizmusát „case control” vizsgálattal, és összefüggést állapítottunk meg a SNP analízissel a PPAR γ haplotípus és a COPD kialakulása között. A GC haplotípusnak mérsékelt védő szerepe van a COPD-t illetően, de rámutathat a potenciális jelentőségére ennek a közös allélnek, és lehet gyenge befolyásoló hatása egy ilyen heterogén betegségben, mint a COPD. A PPAR γ haplotípus COPD-vel történő asszociációja képezheti az alapját további vizsgálatoknak, és fontos tényező lehet a COPD patogenezisében, és potenciális target kezelésnek képezheti az alapját (Poliska Ph.D alapja)(101).

III.: A BioSystems International kft-vel következő közös kutatásunk (2422-2005 DE OEC, 2005. 11. 29). 2005-ban indult el. *Dr. Takács László, Dr. Csánky Eszter: BSÍ Comprehensive Pilot and Biomarker Early-Validation (50-50) studies for COPD GPCR target and biomarker discovery* címmel. Vizsgálataink iránya az alábbi volt:

1. A „pilot” vizsgálat során bronchoalveoláris lavage-ból arachidonsav metabolitokat vizsgáltunk, mint potenciális biomarkereket – erről részletesen beszámolok ebben a disszertációban.
2. Tüdőrákban szenvedő betegekből eltávolított műtéti szövettani anyagból, a diagnosztikára nem kerülő szövet részleteken végeztünk vizsgálatokat.
3. Tüdőrákban szenvedő betegekből a betegek perifériás véréből monoklonális antitesteket állítottunk elő.

A kísérletek ígéretes mérföldköhöz értek. Az egyes platformok (genetika, génprofilizálás, proteomika és metabolomika) segítségével átfedő és etnikailag (a hazai körülményeket figyelembe véve) homogén anyagon új biomarker jelölteket fedeztünk fel és több esetben ezeket kvalifikáltuk is.

További kísérletek célja lehet a távoli jövőben, hogy együttesen vizsgáljuk az új paramétereket és független kohorszokon megvizsgáljuk, hogy a több marker típusból álló panel segítségével vajon hatékonyan (>80% érzékenység, >80% specifikussággal) kiválaszthatjuk-e a COPD tünetmentes dohányzó populációból azon veszélyeztetett egyéneket, akiknek várhatóan a jövőben COPD-je fog kialakulni. A dohányzásról történő komplex leszoktató programok segítségével, pulmonológiai követéssel, a szemlélet átalakításával, a betegek korai kezelésével javíthatunk mind az effektív kornormalizált morbiditási mind a halálozási statisztikákon hazánkban.

2.6. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám hosszabb távú célja az, hogy hipotézis nélküli és hipotézis által vezérelt biomarker kutatással elősegítsem egy új laboratóriumi diagnosztikában használható panel felfedezését, kvalifikációját és validációját.

I.: COPD-ben szenvedő dohányos betegek és COPD-ben nem szenvedő dohányosok szérum protein könyvtárának az összehasonlítása és potenciális biomarkerek azonosítása. Az új paneltől azt várom, hogy segítsen a COPD korai felismerésében, ezzel segítsen a hatékonyabb kezelésben.

Specifikus kérdéseim:

1. Tartalmaz-e a plazma proteome új COPD specifikus biomarkereket?
2. Találunk-e a plazmában olyan biomarkereket, amelyek megkülönböztetik az „egészséges” dohányos és a dohányos COPD-s beteget – potenciálisan alkalmas a veszélyeztetett dohányosok kiszűrésére
3. Alkalmazható-e a monoklonális ellenanyag alapú proteomika az új markerek felfedezésére és kvalifikációjára

II.: Munkám további célja, hogy a relatíve elhanyagolt metabolom biomarker vizsgálatot is bevezessem a COPD kutatásban. Első lépésben azt vizsgáltuk, hogy a patológiás folyamathoz közeli helyről vett bronchoalveoláris lavage folyadékban, mint a betegség „direkt lenyomatában” sikerrel alkalmazható-e a célzott lipid biomarker kutatás.

Specifikus kérdéseim:

1. Célzott (hipotézis vezérelt) metabolom vizsgálattal találunk-e lipid mediátorokat, a BAL folyadékban melyek specifikusak COPD-re.
2. Korrelálnak-e a BAL-ban található lipid biomarkerek a COPD-re specifikus légzésfunkciós paraméterekkel?
3. Alkalmazható-e a hipotézis vezérelt metabolom kutatás új markerek felfedezésére és kvalifikációjára COPD-ben?

III.: Eredményeink generálnak-e specifikus új hipotéziseket?

A jelen értekezés a proteomikai és a lipid metabolom vizsgálatával kapcsolatos kezdeti eredményeinket foglalja össze.

3. BETEGEK, ANYAGOK, MÓDSZEREK

3.1 BETEGEK BEVÁLASZTÁSÁNAK ÁLTALÁNOS ELVEI

A betegek beválasztása a vizsgálatba a debreceni Egyetem, Orvos és Egészségtudományi Centrum (DE OEC) Tüdőgyógyászati klinikáján történt. A klinikai protokoll megfelelt az Európai Unió szabályozásainak és a DE OEC etikai bizottsága jóváhagyta a 2003-as Pfizer vizsgálati protokollt (A9001156, etikai engedély szám 2058-2003 DE OEC), 2003. június 16-án, és a BioSystems vizsgálati protokollt (2422-2005 DE OEC) 2005. november 29-án. Valamennyi beteg a vizsgálatra vonatkozó részletes betegtájékoztatót kapott, és beteg-beleegyező nyilatkozatot írt alá, a felvetődő kérdéseire részletesen válaszoltam. Vizsgálatunkba 45 évesnél idősebb a vizsgálat idején is dohányos férfiakat választottunk, akik több mint 5 csomagév dohányzási anamnézissel bírtak. A betegek részletes orvosi vizsgálaton estek át. Testsúly, testmagasság mérés történt. A beválasztott betegek mellkas röntgen felvételén kóros nem volt látható, a leadott köpeteik Koch negatívak voltak. A vizsgálatból kizártuk azokat, akik madártenyésztéssel foglalkoztak. Részletes légzésfunkciós vizsgálat, testplethysmográfia történt és ennek alapján soroltuk be a betegeket GOLD (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease 2003) protokoll alapján a COPD megfelelő stádiumaiba.

A COPD-s beteg csoport a GOLD II stádiumába tartozott, $50\% < FEV_1 < 80\%$ (100 µg salbutamol hatására a reverzibilitás $< 12\%$, vagy 200 ml.), a $FEV_1/FVC < 70\%$. A kontroll csoportba azokat a betegeket soroltuk, akiknek nem voltak COPD-re jellemző klinikai tünetei (visszatérő köhögés, köpetürítés, terhelésre jelentkező fulladás) és légzésfunkciós eltérései: $FEV_1 > 80\%$, $FEV_1/FVC > 80\%$. A betegek beválasztási és kizárási kritériumait a 3.1 táblázat tartalmazza.

A bevont betegektől és a kontrolloktól 2x7 ml vért vettünk a felső végtag vénáiból, klinikai rutin szerint, polypropylene csövekbe plazmanyerésre, a csöveket azonnal jégre helyeztük és 30 percen belül lecentrifugáltuk, és a vizsgálatig -80°C -on tartottuk. A betegeknél akkor végeztük a vérvételt, amikor a klinikai állapota, vagy a soron következő kontroll miatt orvosi szempontok alapján indokolt volt a vérvétel. A betegeket felvilágosítottuk a kutatásunk lényegéről, a 2 cső véradásába beleegyeztek, a betegtájékoztatót elolvasták és a beteg-beleegyező nyilatkozatot aláírták.

3.1.1 Légzés funkciós vizsgálatok és reverzibilitási teszt

A testplethysmográfias vizsgálat során (Piston Body Plethysmography), a nyugalmi vital kapacitást (inspiratory vital capacity, IVC) FEV_1 , és a statikus, és dinamikus volumeneket határoztuk meg az ATS és az ERS légzésfunkciós protokollja alapján (169,170). A vizsgálatot a GOLD protokoll leírásának megfelelően végeztük. A vizsgálatot több, de legalább két alkalommal ismételtük és az 5%-os hibahatáron belüli értékeket fogadtuk el. Az Európai Szén és Acéltermelő közösség által meghatározott referencia értékeket használtuk vizsgálatainkhoz. A betegeket stabil, infekciómentes állapotban vizsgáltuk, a vizsgálat előtt 6 órával nem használtak rövid hatású β -agonista szert, vizsgálat előtt 12 órával nem használtak hosszú hatású béta agonista szert, vizsgálat előtt 24 órával nem használtak retard theophyllin készítményt (lásd 3.1 táblázat beteg beválasztási és kizárási kritériumok). A részletes légzésfunkciós vizsgálat alapján soroltuk be a betegeket GOLD 2003-as protokoll alapján a COPD megfelelő stádiumaiba. A GOLD stádium beosztása, – a beteg légzésfunkciós értékeinek referencia értékekhez való százalékos aránya alapján történő besorolása – az I-IV stádiumig 2011. decemberéig azonos maradt a GOLD ajánlás évente levő megújulásai alatt. A kontroll csoportba azokat a betegeket soroltuk, akiknek nem voltak COPD-re jellemző klinikai tünetei (visszatérő köhögés, köpetürítés, terhelésre jelentkező fulladás) és légzésfunkciós eltérései, $FEV_1 > 80\%$, $FEV_1/FVC > 80\%$. A

légzésfunkciós vizsgálat során, ha a betegnél obstruktív ventilációs zavart találtunk, akkor 400 µg salbutamolt inhaláltattunk vele és 15 perc múlva megismételtük a légzésfunkciós vizsgálatot, ha a reverzibilitás <12%, vagy 200 ml volt, akkor tekintettük a beteget COPD-snek és megállapítottuk, hogy a légúti obstrukciója irreverzibilis, vagy csak részlegesen reverzibilis.

3.1.2 Bronchoalveoláris lavage (BAL)

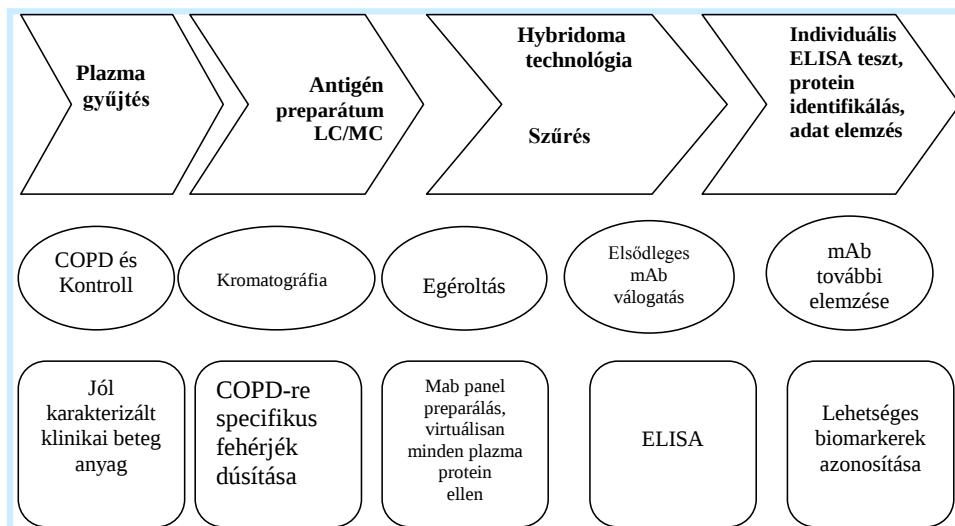
Azoknál a betegeknél, akiknél klinikai szempontok alapján indikált volt bronchofibroszcopiát és bronchoalveoláris mosást végezni azokat vontuk be a vizsgálatba. A bronchoszcopiát általában trachea dyskinézis, és tüdőtumor kizárása illetve bronchus váladék nyerésére végeztük. A bronchoalveoláris mosás indikációja baktériumtenyésztés, illetve citológiai vizsgálatához történő mintavétel volt. A felső légutakat 2%-os lidocain sprayvel érzéstelenítettük. A bronchofibroszcopiát szokásos módon végeztük, a bronchoszcopot a jobb középsőlebenybe vezettük és bronchoalveoláris mosást végeztünk 6x50 ml fiziológiás konyhasóoldattal. A bronchofibroszcopiát és a BAL-t az Európai Tüdőgyógyász Társaság (ERS European Respiratory Society) ajánlása alapján végeztük el (171). A klinikai, diagnosztikai vizsgálatra nem kerülő folyadékot használtuk a kísérleteinkhez.

	COPD	Kontroll
Beválasztási kritériumok	50 % < FEV ₁ < 80 %	FEV ₁ > 80%
	FEV ₁ /FVC < 70%	FEV ₁ /FVC > 80%
	Reverzibilitás < 12%, vagy 200 ml	
	Az elmúlt 3 hónapban nem volt akut exacerbáció	
	45 évesnél idősebb kaukázusi férfi	
	Jelenleg is dohányzik, legalább 5 csomagév dohányzási szokás	
	A reggeli vérvételt megelőző éjszaka nem fogyasztott, ételt, és alkoholt	
Kizárási kritériumok	IgE >120 U/ml	
	α-1 tripszin hiány	
	Ismert asthma, atopiás megbetegedés és ekzema	
	HIV, hepatitis B és C pozitivitás	
	Gyermekkori tüdőbetegségek, cystás fibrozis, bronchiectasia, TBC, foglalkozási betegségek	
	Más gyulladásos megbetegedés, autoimmun, kötőszöveti betegségek, degeneratív ízületi betegségek, gyulladásos bélbetegségek, psoriasis stb.	
	Légúti gyulladás az elmúlt 3 hónapban	
	Az elmúlt 3 hónapban, gyógyszerkipróbálásban való részvétel	
	Influenza és Str. pneumoniae elleni védőoltás az elmúlt 2 hétben	
	Inhalációs, szisztémás, lokális és orr sprayben alkalmazott corticosteroid, immunszuppresszív kezelés az elmúlt 3 hónapban	
	Kromoglikát, leukotrén antagonistá kezelés az elmúlt 8 hétben	
	Antibiotikus kezelés az elmúlt hónapban	
	β-2 agonista, anticholinerg, theophyllin kezelés az elmúlt héten	

3.1. táblázat: A vizsgálatba történő beteg beválasztás és kizárási kritériumai.

3.2 MÓDSZEREK: A BIOMARKEREK FELFEDEZÉSE ÉS KVALIFIKÁLÁSA

COPD-re specifikus monoklonális antitest könyvtárát állítottunk elő *nascens* (hibridóma felülűszó formában) monoklonális ellenanyag proteomika elvei szerint és a megszokott protokollt követve. Ezzel egy lépésben kandidátus biomarkereket fedeztünk fel és megindítottuk a kvalifikáció folyamatát is. A vizsgálat sémás tervét a 3.2 ábrán mutatom be (172).



3.2. ábra: Sematikus ábra a monoklonális antitest által mediált biomarker azonosítás és validálás folyamatára.

3.2.1 A minták előkészítése az antigén preparátum készítéséhez

Először Agilent MAR6 (Thomas Scientific, Swedesboro N.J.) oszlopot használtunk a gyártó által javasolt technika felhasználásával, azért hogy a plazmában található hat leggyakoribb plazma proteint eltávolítsuk. A következő lépésben a polyclonalis, affinitás kromatográfiás oszlop segítségével, amely a plazmafehérje koncentráció dinamikus tartomány további csökkentéséhez járult hozzá, és a COPD-re specifikus fehérjék dúsítása történt. (172).

3.2.2 Monoklonális antitest előállítás

Immunizálásra és monoklonális antitest előállításra Harlow (173) protokollját használtuk, Bristol módosításával (174). Az immunizált nőstény Balb/c egerek lépsejtjeit polyethylenglikoll segítségével szomatikus hridizáció során fuzionáltattuk Sp2/Ag0 myeloma sejtekkel a szokványos protokollt követve (134). Antitesttermelő klónokat Hypoxantin, Aminopterin, Thymidine, (HAT) médium segítségével választottuk ki és az antitesttermelőket tenyésztettük tovább.

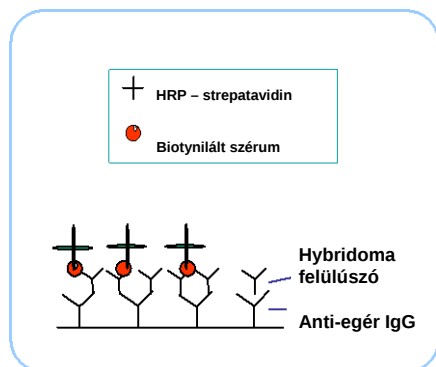
3.2.3 Hybridoma felülűszók szűrése, a

COPD-re specifikus monoklonális IgG előállítása és kvalifikálása

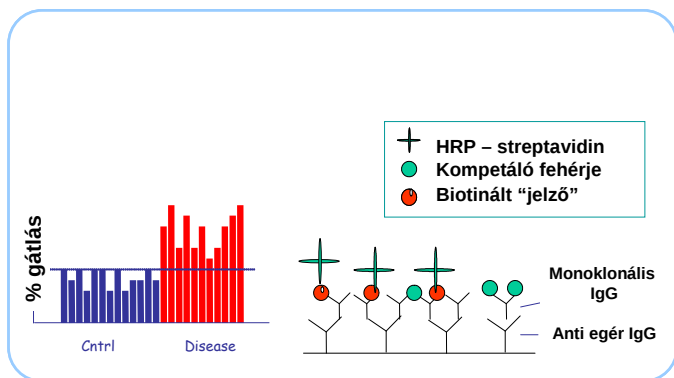
A *nascens* hibridóma felülűszókat a 3.3. ábrán bemutatott „capture” ELISA elv alapján szűrtük, a COPD-re specifikus jelet adó klónokat kiválasztottuk klónozásra és IgG termelésre. A klónozás a már korábban leírt módon történt (134). Az IgG-t is standard protokollokat követve ascitesből állítottunk elő.

Hibridóma szűrés és további kvalifikációs mérések: A hibridóma felülűszokban jelenlevő minimális mennyiségű IgG-t (~1-20 ng/vizsgálat) anti-egér IgG-vel (kecskéből származó, gamma lánc specifikus

ellenanyag) kötöttük meg. A mikro-nyílásokat ezután a betegekből illetve ezzel parallel a kontroll csoportból származó kevert (poolozott) plazma mintákkal inkubáltuk, a mintákból történő nagy mennyiségű fehérjék eltávolítása és biotinálás után. A reakció avidin peroxidáz komplexekkel, a peroxidáz enzim aktivitás kvantitatív mérésével (kinetikus vizsgálat) hívtuk elő. Azokat a hibridómákat választottuk ki, melyek felülűszójában levő IgG >1,5-szeres eltérést mutatott. A módszer részleteit közöltük (172). További vizsgálatokat, melyeket az un. gátlási assay-vel hajtottunk végre, egyéni plazmamintákon végeztük, ahol nem biotinált depletált plazma gátló hatását mértük. A kompetitív gátlás a kontrol plazmából származó biotinált „jelző” és a vizsgált plazma minta fehérjei között történt. A mérés elvét a 3.4. ábrán mutatom be. A biomarker relatív koncentrációjának növekedésével a gátlás növekszik.



3.3 ábra: Nascens monoklonális ellenanyag könyvtár szűrési elve („capture” assay). A hibridóma felülűszókban jelenlévő minimális mennyiségű (~1-20 ng/vizsgálat) gamma lánc specifikus anti-egér IgG-t kötöttünk meg. A mikro-nyílásokat ezután a betegekből illetve ezzel parallel a kontroll csoportból származó kevert (poolozott) plazmamintákkal inkubáltuk, a mintákból történő nagy mennyiségű fehérjék eltávolítása és a biotinálás után. Azokat a hibridómákat választottuk ki, melyek felülűszójában levő IgG >1.25 szeres jel (peroxidáz aktivitás) eltérést mutatott. A kiválasztott hibridómákat megklónoztuk, és a belőlük származó IgG-vel az 3.4 ábrán látható séma szerint egyéni plazmamintákon is végeztünk méréseket (nem közölt adatok).



3.4. ábra: A kompetíción alapuló mérés. A mérés során a korábbi szűrési lépésben kiválasztott, klónozott és tisztán előállított monoklonális ellenanyagot használtuk. Az tiszta ellenanyagot anti-egér IgG-vel kötöttük, majd a mérendő abundans fehérjementes plazma mintákat összekevertük a biotinált „jelzővel” amit normal plazma mintából preparáltunk. A gátlást a maximalis szignál (gátlószer nélküli jel) %-ában fejeztük ki.

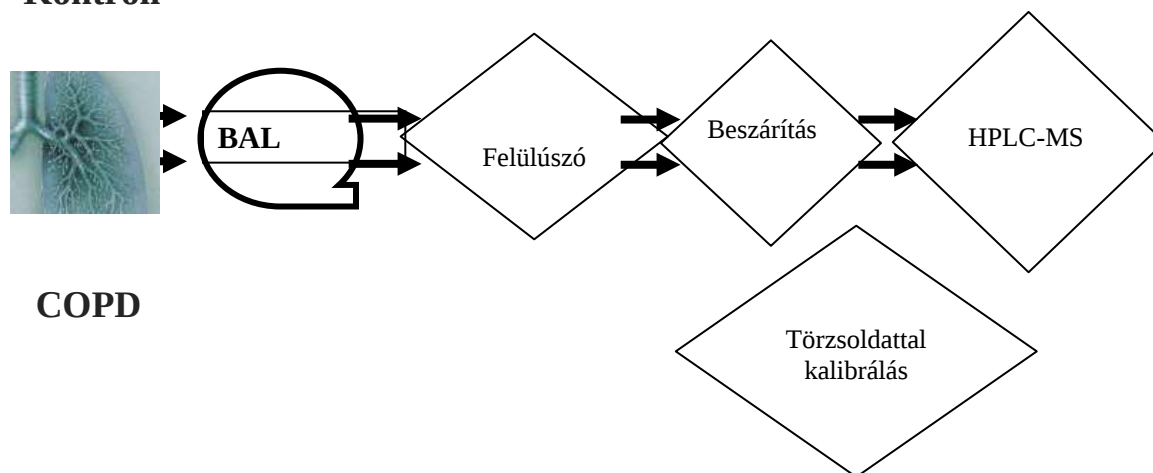
3.2.4. Fehérje identifikáció LC-MS/MS használatával

A szűrés és a további kvalifikáció után azokat az ellenanyagokat, melyek biomarker aktivitást mutattak további vizsgálatoknak vetettük alá. Az ellenanyagok által felismert vérfehérjéket tömegspektrometriás méréssel azonosítottuk a mérés elve LC-MS/MS volt.

3.3 MÓDSZEREK: A LIPID METABOLIT ASSAY

A lipid metabolit assay kísérleti tervét a 3.5 ábra mutatja.

Kontroll



3.3 ábra: Sémás rajz a lipid metabolit kísérletekhez.

3.3.1. A BAL folyadék előkészítése

A BAL mintákat 1:1 arányban ethyl-acetattal (EE) extraháltuk. Az EE extractumot vákummal beszárítottuk (Eppendorf concentrator 5301, Eppendorf, Germany) 30°C-on. A beszárított anyagot 100 µl etanolban feloldottuk, lecentrifugáltuk és a felülúszót ismételtén, és az előzővel azonos módon beszárítottuk. A beszárított anyagot 60 µl etanolban, feloldottuk, és 6 µl izotóp keveréket adtunk hozzá (izotóp keverék: d₈-15-HETE és d₄-PgD₂), és ebből 10 µl azonnal HPLC-MS analizáltunk.

3.3.2. Lipid HPLC-MS

A HPLC-MS analízist a Waters 2695X HPLC (Waters, Budapest, Hungary) szeparációs módban alkalmaztuk, mint ezt már munkacsoportunk korábban közölte (175).

3.3.3. A lipidek azonosítása

Lipid standard törzsoldatokat kereskedelembe vásárolható standard oldatokból készítettük, 15-HETE, dX-15-HETE, dX-PgD₂ and PgD₂ (Cayman chemicals Co., Ann Arbor, USA) és az EPA (Larodan Fine chemicals AB Malmö, Sweden) termékét használtuk, úgy hogy az oldat végső koncentrációja 1000 ng/ml volt. A törzsoldatokat sötétben -80°C-on tároltuk. Többszörös kalibrációt használtunk a referencia retinoidok méréséhez különböző koncentrációjú (1, 10, 100, 1000 ng/ml) ethanol befecskendezése mellett, 1 µl injektálva. A mérés érzékenysége 5 ng/ml volt 15-HETE és EPA esetén és 10 ng/ml volt PgD₂ esetén, a lineáris regressziós koefficiens nagyobb volt, mint 0,99.

4. EREDMÉNYEK

4.1. MONOKLONÁLIS ANTITEST GENERÁLÁS

4.1.1. Klinikai adatok a monoklonális antitest generálásban részt vett betegekről

Két, tisztán klinikailag megkülönböztethető betegcsoport plazmáját használtunk a biomarker vizsgálatainkhoz. Dohányos férfiak vettek részt a vizsgálatainkban. Harminc beteg a GOLD alapján a COPD II stádiumába tartozott, és másik harminc dohányos férfi, képezte a kontroll csoportot, akik dohányzási szokásait, és életkorukat illetően egyeztek a COPD-s populációval. A kontroll csoportnak COPD klinikai tünetei nem voltak, légzésfunkciós vizsgálat során élettani értékeket találtunk és nem találtunk obstruktív ventilációs zavarra utaló eltérést. (4.1. táblázat). A COPD diagnózisa alapvetően klinikai alapokon nyugszik, a diagnózis kimondásának az alapja a jellegzetes klinikai tünetek alakulása, (köhögés, köpetürítés, nehézlégzés), amely tünetek megléte mellett légzésfunkciós vizsgálattal obstruktív ventilációs zavar észlelhető. A diagnózis kimondásához elengedhetetlen az irreverzibilis vagy csak részlegesen reverzibilis FEV₁ csökkenés kimutatása, úgy hogy emellett FEV₁/FVC érték 70% alatt marad, a bronchodilatációs kezelés után is. Ezért olyan betegeket választottunk a vizsgálatunkba, akiknek a betegsége már jól karakterizálható, és várhatóan a közeljövőben progrediálni fog, és állapotuk még nem végstádiumú (4.1 a, 4.1b és 4.2 táblázat). A betegek a GOLD protokoll alapján a COPD II. stádiumába tartoztak. Az utóbbi években a GOLD protokoll sokat változott, ennek ellenére a stádium beosztás az elmúlt kb. 10 évben változatlan maradt, 2011. decemberében, pedig alapjaiban megváltozott. A betegek és a kontrollok életkora, korábbi dohányzási anamnézise (PPY), és testtömeg indexe jó korrelációt mutat egymással, aláhúзва azt, hogy a két csoport klinikai adatai is összehasonlíthatóak, így várhatóan a molekuláris paramétereik is összehasonlíthatóak lesznek. Statisztikailag szignifikáns különbséget találtunk a FEV₁, a FEV₁/FVC az IVC, az RV emelkedés és Raw értékben a két csoport között. Ezeket a klinikailag mérhető, betegség-specifikus paramétereket kívánjuk kiegészíteni még érzékenyebb biomarkerek felfedezésével, amelyek a későbbiekben még érzékenyebb és még specifikusabb klinikai laboratóriumi tesztek alapjául szolgálhatnak, amelyek a betegség korai felismerésében, diagnosztikájában, követésében és kezelésében is szerepet játszhatnak.

4.1.2. A COPD-re jellemző specifikus biomarker jelölt monoklonális ellenanyagok és fehérjék.

A teljes monoklonális antitest alapú biomarker generálásunk sematikus folyamatát a 3.2 ábrán tüntettem fel. Az első öt kontrollnak és az első öt COPD-ben szenvedő betegnek a plazma keverékét használtuk immunogénként. A betegek és a kontroll csoport legfontosabb légzésfunkciós paramétereit és a dohányzási szokásait, valamint a testtömegindexre vonatkozó adatokat a 4.2-es táblázat mutatja. Jól látható, hogy statisztikailag szignifikáns különbségek láthatók a monoklonális antitest generáláshoz és az első, legkritikusabb szűrési lépéshez (amit a 3.3 ábrán bemutatott módszerrel végeztünk) felhasznált COPD-ben szenvedő betegek és a kontroll egyének paramétereiben. A két csoport életkor, dohányzási szokásait és testtömeg indexét tekintve nem mutat különbséget. Mindez kiemelkedően fontos, mert a nascens monoklonális ellenanyag könyvtárból a két plazmakeverék (COPD és kontroll) összehasonlító szűrésével, amit a 3.4 ábrán bemutatott „capture” elv alapján hajtottunk végre, ennek az elvnek a figyelembe vételével választottuk ki azokat a hibrodomákat, melyeket a további lépésekben egyedi plazma minták segítségével vizsgáltunk; a 3.4 ábrán bemutatott gátlási elv szerint.

4.1.2.1 Az immunogén előállításához és az első ellenanyag szűrési lépéshez felhasznált COPD-s betegek és kontrollok plazma proteomja

Először a 6 leggyakoribb plazma proteint eltávolítottuk a plazma keverékekből affinitás kromatográfiával. Ez a módszer összességében körülbelül 10-szeresére dúsította a biomarker profilírozás szempontjából fontos fehérjéket (4.3.kép, 2 sor). A második lépésben a kromatografiás oszlopra normál humán plazma ellenes poliklonális ellenanyagot rögzítettünk, és ezen az oszlopon áramlott át az első lépésben depletált plazma, azért hogy a COPD-s markereket dúsítsuk és csökkentjük a dinamikus tartományt (normalizáció) az átfolyó mintában (4.3.kép, 3 sor). Ezt, a második oszlopon az átáramlott proteint használtuk immunizálásra. A második affinitás kromatográfiának az volt a célja, hogy dúsítsuk a betegség specifikus fehérjéket és csökkentjük a dinamikus tartományt. A fehérjék oszlopról történő kimosását nátrium dodecil-szulfát poliakrilamid gél elektroforézissel (SDS-PAGE) végeztük, 4.3 kép) és LC/MS-val (4.4 és 4.5 táblázat) ellenőriztük az eredményességét.

A monoklonális antitest generálásban részt vett, aktívan dohányzó COPD-s férfi betegeink antropometriai adatai					
Kód	Életkor	BMI	Foglalkozás	PPY	COPD típusai a klinikai és LF adatok alapján
COPD 1	59	27,72	műszaki vezető	37,5	Krónikus bronchitis
COPD 2	46	21,56	segéd-munkás	18,75	Emfizéma
COPD 3	57	35,86	lakatos	39	Emfizéma
COPD 4	71	24,98	tanító	28	Emfizéma
COPD 5	60	31,92	lakatos	30	Emfizéma
COPD 6	67	27,04	munkagép-vezető	82,5	Krónikus bronchitis / Emfizéma
COPD 7	55	20,72	víz-gázszerelő	64,5	Emfizéma
COPD 8	65	26,47	üzemvezető	20	Emfizéma
COPD 9	53	26,47	nyomdász	15	Krónikus bronchitis / Emfizéma
COPD 10	66	21,55	segédmunkás	45	Krónikus bronchitis
COPD 11	54	32,65	mező-gazdász	18	Emfizéma
COPD 12	54	23,24	technikus	35	Krónikus bronchitis
COPD 13	55	27,38	grafikus	70	Krónikus bronchitis
COPD 14	55	20,96	sofőr	32	Krónikus bronchitis
COPD 15	50	16,53	parkettás	22,5	Emfizéma
COPD 16	52	21,55	technikus	30	Emfizéma
COPD 17	56	26,70	mentős	30	Krónikus bronchitis / Emfizéma
COPD 18	52	24,16	asztalos	20	Krónikus bronchitis / Emfizéma
COPD 19	70	31,22	raktáros	55	Emfizéma
COPD 20	53	29,05	betanított munkás	15	Emfizéma
COPD 21	70	24,68	tanár	37,5	Krónikus bronchitis
COPD 22	62	25,06	mérnök	15	Emfizéma
COPD 23	58	26,58	technikus	10	Emfizéma
COPD 24	66	25,59	csőszerelő	18	Emfizéma

4.1a. táblázat: A monoklonális antitest generálásban részt vett COPD-s betegek antropometriai adatai.

A monoklonális antitest generálásban részt vett, aktívan dohányzó kontroll férfi antropometriai betegeink adatai				
Kód	Életkor	BMI	Foglalkozás	PPY
KONTROL 1	45	33,57	beteghordó	37,5
KONTROLL2	49	34,72	villanyszerelő	18,75
KONTROLL3	52	0,00	bankigazgató	37,5
KONTROLL4	57	24,21	üzemvezető	30
KONTROLL5	48	24,07	taxis	38
KONTROLL6	73	25,56	kereskedő	30
KONTROLL7	61	26,45	víz-gáz szerelő	21
KONTROLL8	73	28,04	katona	39
KONTROLL9	49	27,73	villany-szerelő	15
KONTROLL10	77	0,00	tanár	21
KONTROLL11	48	24,07	építész	25
KONTROLL12	47	31,35	portás	36
KONTROLL13	57	30,11	divattervező	61,5
KONTROLL14	61	21,30	testnevelő tanár	23
KONTROLL15	49	28,40	testnevelő tanár	20
KONTROLL16	53	30,07	nővér	23
KONTROLL17	50	24,21	technikus	30
KONTROLL18	49	21,04	technikus	34
KONTROLL19	47	29,22	mozdonyvezető	22,5
KONTROLL20	65	25,86	gépkocsi-vezető	33,75
KONTROLL21	45	34,48	taxis	30
KONTROLL22	45	28,04	szakács	35
KONTROLL23	48	31,80	lakatos	34,5
KONTROLL24	45	23,95	mérnök	28
KONTROLL25	51	30,10	portás	23,25

4.1b. táblázat: A monoklonális antitest generálásban részt vett dohányos egészséges egyének (kontrollok) antropometriai adatai.

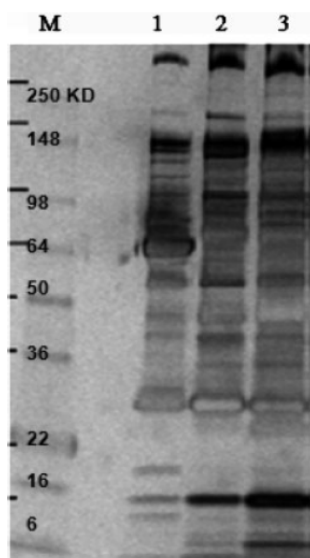
Az immunogén és az első szűrési lépésben felhasznált plazma proteom keverék minőségét, shotgun tömegspektrometriás módszerrel ellenőriztük. Megvizsgáltuk, hogy a MAR és a poliklonális (anti human szérum) oszloppal történő deplécio és a normalizáció után hány különböző fehérjét tudunk azonosítani. Az eredményeket a 4.5 táblázat mutatja. Célunk itt az volt, hogy meggyőződjünk arról, hogy az abundans fehérjék eltávolítása és a normalizálási lépés hatása érvényesül-e abban, hogy a shotgun tömegspektrometriás analízissel detektálható fehérjék száma nő. Fontos volt azt is tudni, hogy a szűrésre alkalmazott két minta vajon hasonló-e ebből a szempontból. A 4.5 táblázat mutatja, hogy mindkét minta, hasonlóan nagyszámú, 100 fölötti, fehérje foltot eredményezett.

Összehasonlításképpen megjegyzendő, hogy teljes plazmában a nagy mennyiségű fehérjék jelenléte miatt „csak” kb. 40 fehérje detektálható, míg a nagy mennyiségű fehérjék eltávolítása után a detektálható fehérjék száma 46. Mindebből jól látszik, hogy a poliklonális (anti-human szérum) oszloppal történő normalizálás hatékonyabban emeli a detektálható fehérjék számát, mint az ezt megelőző lépés. Az egyes lépéseket követően, megvizsgáltuk hogy néhány abundans fehérje detektálható-e. Az eredmények alapján a mintákat kielégítő minőségűnek ítéltük meg, mert az abundans fehérjék közül, pl. az albumin nem volt detektálható néhány fehérjét 1-2 peptid képviselt, ami

alacsony reprezentációnak felel meg. A deplécios/normalizációs preparátum előállítás módszerét többször megismételtük, a módszer hatékonyságának illusztrálására egy tipikus kísérletet mutatunk be a 4.5. táblázatban.

	COPD	Kontroll	p< 0.01
Életkor	58.8 ± 6.98	53.76 ± 9.47	0.049
Csomagév (PPY)	32.84 ± 18.85	29.89 ± 9.65	0.49
Testtömegindex (BMI)	25.81 ± 4.35	25.53 ± 8.57	0.88
FEV ₁	60.66 ± 7.96	102.55 ± 9.71	2.76x10⁻²¹
FEV ₁ /FVC	59.42 ± 5.42	86.01 ± 4.66	3.79x10⁻²³
IVC	3.63 ± 0.59	4.55 ± 0.69	8.57x10⁻⁶
RV %	190.66 ± 47.99	126.66 ± 26.87	5.32 x10⁻⁷
RV - RV _{ref}	2.11 ± 1.10	0.55 ± 0.59	1.36 x10⁻⁷
Raw	0.29 ± 0.16	0.16 ± 0.03	0.00639

4.2. táblázat: Statisztikailag szignifikáns különbségek láthatók a monoklonális antitest generáláshoz felhasznált COPD-ben szenvedő betegek és a kontroll egyének légzésfunkciós paramétereiben, mind a dinamikus, mind a statikus paramétereket illetően. A két csoport életkor, dohányzási szokásait és testtömeg indexét tekintve nem mutat különbséget



4. 3. kép: A hat legjellemzőbb protein eltávolítása affinitás kromatográfiával/SDS PAGE-sel.

Sorok: 1. standard (250, 148, 98, 64, 50, 36, 22, 16, 6 KD); 1. plazma Agilent oszlop kromatográfia után, 3. Agilent oszlop kromatográfiával és poliklonális oszloppal kimerített plazma minta

Minta	Proteinek száma
Kontroll	116
COPD	138

4.4 táblázat: COPD-re és a kontrollokra jellemző specifikus fehérjék száma, MAR oszloppal és poliklonális antitest kimerítéssel azonosítva.

4.1.3 Monoklonális antitest előállítás

Ezt követően a kontrollok és a COPD-ben szenvedő betegek plazma proteinjéből készült immunogén keveréket BALB/c egerbe injekciótunk. Négy egér lépét (2-2 kontroll és COPD-ben szenvedő beteg plazmájából előállított proteinnel immunizált állat) használtuk hybridoma készítéséhez, a szokásos sejt fúziós technikát alkalmaztunk. A Összesen 3500 hybridoma felülűszót generáltunk, és ELISA-val szűrtünk a 3.2, 3.3, 3.4. ábrán bemutatott módon (176).

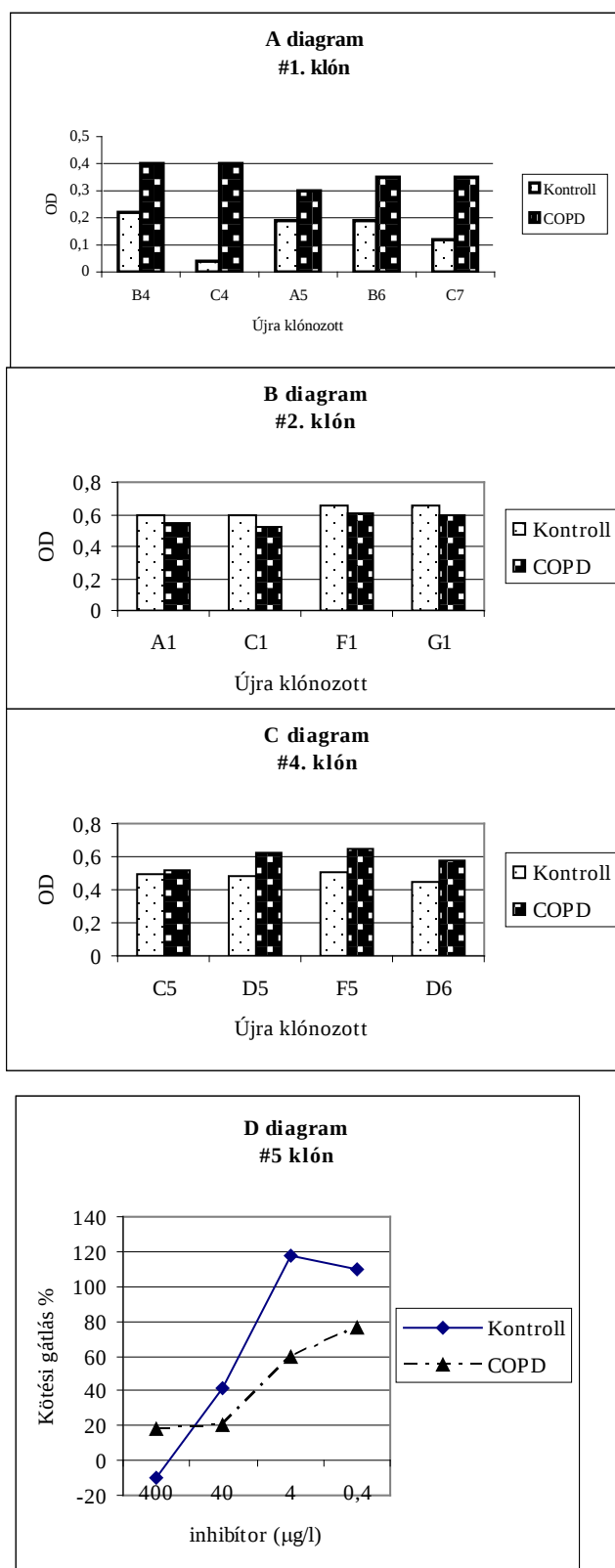
	Proteinek száma	Major proteinek
Teljes plazma (Sigma)	40	valamennyi látható
Agilent affinitás chromatografiával eltávolított	46	2 peptid transferrinből
		1 peptide haptoglobinból
		1 peptid IgG-ből
POROS protein G és poliklonális oszloppal eltávolított	82	Egyik sem a 6 (HSA, IgG, IgA, transferrin, haptoglobin, antitrypsin)

4.5. táblázat: A fehérjék száma és a major proteinek, (amelyeket Agilent MAR-6 oszloppal eltávolítottuk Albumin (HSA), transferrin, fibrinogen, haptoglobin, IgG, IgA, antitrypsin, α 1 antichymotrypsin, α -1-acidikus glikoprotein) amelyet liquid chromatografiával/ és tömegspectroszkópiával azonosítottak a teljes plazmából, és MAR oszlopon kiürített plazma és poliklonális antitesttel kimerített plazma. A táblázat egy tipikus depléciós kísérletet mutat, ahol shotgun tömegspectrometriás méréssel vizsgáltuk az egyes depléciós illetve normalizációs lépések hatékonyságát a tömegspectrométerrel detektálható fehérjék számát illetően és a detektálható abundans proteinek minőségét illetően. A táblázat jól mutatja, hogy a tömegspectrométer lényegesen több fehérjét ismer fel a depletálást követő normalizáció után, mint előtte.

4.1.4. Monoklonális antitestek szűrése

Az ellenanyag könyvtárban a „nascens” hibridómák között jelentős számban van olyan, ami IgM-et termel (kb. 30%) és olyan is, ami kevert, 2-3 klónt tartalmaz. Az IgM ellenanyagot tartalmazó felülűszókat nem kívántuk használni, mert általában alacsony affinitásúak és nem használhatók jól diagnosztikumként. Egyes felülűszók alacsony <50 ng/ml IgG-t tartalmaznak (20-30 %). Gyakorlatunkban ezek a szupernatánsok nem mutatkoztak használhatónak, mert a klónozás alatt a sejtvonal stabilizálódása gyakran vezet az ellenanyag elvesztéséhez. A fenti okok miatt első lépésben kvantitatív IgG szint mérést végeztünk és kiválasztottuk azokat a szupernatánsokat, melyek több mint 50 ng/ml IgG-t tartalmaztak. Az első biomarker felfedezést célzó lépést is az >50 ng/ml IgG tartalmú felülűszókon végeztük. Az első lépésben 30 COPD-s és 30 kontroll plazmáját kevertük össze. A plazmakeverékből eltávolítottunk 7 abundans plazmafehérjét (Agilent oszlop) a már leírt módszerrel. A maradék fehérjekeveréket NHS biotin észterképző reagenssel biotináltuk. A szűrés elvét a 3.3 ábrán mutattam be. A kiválasztás feltétele az volt, hogy a kötődési különbség nagyobb legyen, mint 25% az egészséges kontroll és a COPD-ben szenvedő beteg között (bármelyik irányú eltérés elfogadható volt). Első lépésként 250 biomarker monoklonális ellenanyag jelöltet találtunk. Az ellenanyag jelölteket a 3.4 ábrán bemutatott elv alapján szűrtük tovább kompetitív gátlási assay-vel egyedi (nem kevert) plazma mintákon. A szűrés elindításakor a kandidátus nascens ellenanyagokkal hígítási kísérleteket végeztünk, azaz meghatároztuk azt a plazmahígítást, amivel a legnagyobb eltérést tudtuk detektálni. Ez általában klónonként eltérő volt. Ugyanakkor, sok esetben a hígítási kísérlet segítségével a COPD és kontroll közötti eltérés detektálásának hihetősége is erősödött, egy ilyen példát mutat a 4.6 D és 4.7 ábra.

A szűrés során pozitívnak mutatózó hibridómákat a monoklonalitás biztosítására megklónoztuk (4.6 A-C ábra). A klónozás során a bemutatott négy legjobb biomarker jelölt esetén a 4.6. A ábrán



4.6. ábra: A-C ELISA assay eredmény a hybridoma felülűző subclonjaiból. D: Kompetitív gátlási assay-vel eredménye az egyes plazma mintákon

bemutatott subclonokat kivéve (4.6. B-D) homogén eredményét kaptunk, azaz a subklónok által termelt hibridóma felülűző azonos vagy legalább is elfogadhatóan hasonló eredményt mutatott az eredeti, nascens könyvtár felülűzőjéhez. A 4.6 A ábrán bemutatott 1-es nascens klón szubklónjai ugyan

hasonló irányú, de eltérő mértékű reakciót mutattak. Itt a legjobb (C4-es) szubklónt választottuk ki további ellenanyag termelésre.

Preferencia: COPD

Gátlási assay, a plazma protein koncentráció

40,00 mg/ml tisztított biotinilált COPD-s plazma proteinnel

Statisztika: Mann-Whitney teszt

$P < 0,0001$

	COPD	Kontroll
Átlag	63,52	44,93
St. Dev	16,15	8,4

Preferencia: Kontroll

Gátlási assay, a plazma protein koncentráció

8,00 mg/ml tisztított biotinilált kontroll

plazma proteinnel

Statisztika: Mann-Whitney teszt

$P < 0,0001$

	COPD	KONTROLL
Átlag	45,65	89,57
St. Dev	9,47	8,93

Preferencia: Kontroll

Gátlási assay, a plazma protein koncentráció

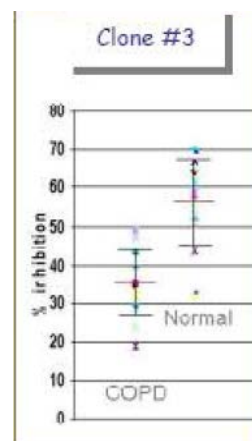
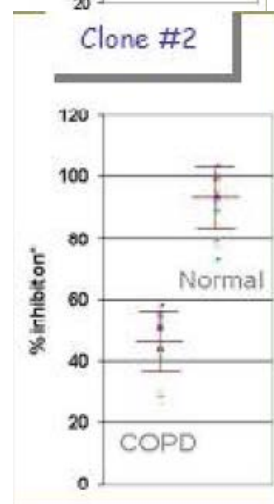
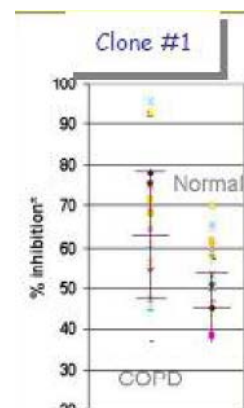
8,00 mg/ml tisztított biotinilált kontroll

plazma proteinnel

Statisztika: Mann-Whitney teszt

$P < 0,0001$

	COPD	KONTROLL
Átlag	36,22	56,75
St. Dev	8,42	11,24



4.7 ábra: Reprezentatív biomarker szűrési eredmények egyéni gátlási assay segítségével, amely statisztikailag szignifikáns eredményt ad a COPD-s betegek és a kontroll egyének plazmája között (Mann-Whitney teszt, $p < 0,0001$)

A kompetitív gátlási módszer alkalmazása az egyedi mintákra azért történt, mert az abundans fehérjéket eltávolító módszer egyrészt költséges, másrészt pedig nehezen reprodukálható. A kompetitív gátlási módszer nem igényel minta előkészítést, így a klinikai gyakorlatban rutinszerűen használt anticoagulánsból történő vérvételből származó mintákat tudtuk használni.

A szűrés 10 klónozott hibridómát eredményezett, a kiválasztott hibridekkel nagyobb mennyiségű monoklonális ellenanyagot állítottunk elő, és a tisztított ellenanyagokat teszteltük tovább. A 4.7-es ábrán mutatom be. Négy példa a 10-ből. Jól látható, hogy a tisztított ellenanyagok biomarker tulajdonságot mutatnak. Érdekes, hogy a bemutatott és a detektált biomarkerek többségének a gátlási assay alapján detektált szintje az első klón kivételével a kontrollokban magasabb (normál preferencia). A vizsgálatokat többször elvégeztük a szignifikancia szintjét a Mann-Whitney, „non-parametrikus” teszttel határoztuk meg. Erre azért volt szükség, mert előzetes analízis során kiderült, hogy a mért eloszlás nem követi a normál eloszlást (138).

A vizsgálat következő lépése az ellenanyag biomarker kandidátusok által felismert specifikus antigének identifikációja és jellemzése. Ezen eredmények rendelkezésünkre állnak, de a Biosystems International titkos szellemi termékeinek egy részét alkotják, így disszertációmban ezt nem tudom szerepeltetni. Röviden annyit szeretnék megjegyezni, hogy az egyik marker a C3 fehérje, amiről már kimutatták, hogy kapcsolt a COPD-vel dohányosokban. Meg kell, jegyezzem azt is, hogy a már közölt kutatások óta kapott újabb eredmények szerint az itt bemutatott protein biomarker detektálás alkalmazható klinikai szinten is a Randox Ltd. által forgalmazott biocsip technológiával (<http://www.randox.com/quantiplasma-array.php>). A biocsipecen a Biosystems International által előállított QuantiPlasma monoklonális ellenanyag könyvtár kerül forgalmazásra. Az ellenanyag könyvtár fejlesztésének és használatának technológiája az itt is bemutatott eredményekre is épül.

4.2 LIPID METBOLIT VIZSGÁLAT EREDMÉNYEI

4.2.1 BETEGEK ADATAI LIPID METBOLIT VIZSGÁLATBAN

A betegcsoport kiválasztásánál alapvető fontosságú volt, hogy a legrészletesebb légzésfunkciós vizsgálat történjen, így a következő paramétereket használtuk az analízisünkhöz, a FEV₁, a PEF (peak expiratory flow) és a TLC (total lung capacity) értéket hasonlítottuk össze a referencia értékekkel. A vizsgált személyeket (COPD-s beteg, és nem COPD-s dohányzó egyén) klinikai tüneteik és légzésfunkciós eredményeik alapján választottuk be a COPD-s és kontroll csoportba. A vizsgálatba beválasztott betegek és kontroll egyének tisztán két csoportra oszlanak, COPD-ben szenvedő és COPD-ben nem szenvedő dohányos egyének csoportjára. A zavaró hatások kiküszöbölésére, csak férfiakat választottunk be a vizsgálatba. Közismert ugyanis, hogy a légzésfunkciós vizsgálatok eredményeit a nem nagymértékben befolyásolja, ugyanis a nők hajlamosabbak a légzésfunkció vesztesésre, mint a férfiak. Szignifikáns eltérés látható a két csoport FEV₁, FEV₁/FVC, és IVC értékeiben (4.8. 4.9. táblázat). A statisztikai analízist student T teszttel végeztük.

4.2.2. A BAL-ban mérhető lipid metabolitok

Az első elképzelés az volt, hogy összefüggést találjunk a légzésfunkciós eltérések és a lipid metabolitok BAL-ban mérhető szintje (koncentrációja) között. Ez a próbálkozás sikertelen volt, mert a COPD-t jól jellemző FEV₁, FEV₁% és a COPD-re nem jellemző PEF értékkel nem kaptunk korrelációt. Az emfizéma mértékére jellemző TLC értékekre viszont kaptunk összefüggést. A BAL folyadékban levő lipid metabolit koncentrációk tehát nem mutattak COPD specifitást. (4.12 táblázat, és PgD₂-ra vonatkozóan a 4.13-4.15 ábra). Megfigyeléseink felvetettek egy hipotetikus modellt a BAL folyadék két csoportba sorolásáról, kompartmentalizálhatóságáról. Indirekt bizonyíték hipotézisünk helyességére az, hogy a visszanyert BAL folyadékban levő összes lipid mediátor mennyiségek

esetenként igen jó korrelációt mutatnak a COPD-re specifikus légzésfunkciós paraméterekkel (FEV₁, FEV₁% és a PEF), 4.12 táblázat, és a PgD₂-re vonatkozóan a 4.13- 4.15 ábra. Így hipotézisünket elfogadtuk munkahipotézisként. A lipid mediátorokra vonatkozó eredményeinket a továbbiakban munkahipotézisünk kontextusában értelmezzük. A BAL folyadékban, mérhető mennyiségben találtunk eicosapentaén savat (EPA), lysophosphatidyl cholin (LPC), 15 hydroxyeicosatetraen savat (15-HETE) és prosztaglandin D₂ (PgD₂) (4.10 ábra). A 4.11 ábrán látható a vizsgálat illusztrálására a standard lipid oldat és a BAL minta összehasonlító görbéje.

kódszám	státusz	PPY	BMI	Vol ki BF	Légzésfunkciós adatok						A BAL-ban mért lipidek			
					FVC	FEV1	Tiffneau	IVC	RV+	RAW	EPA	LPC	HETE	PgD2
				ml	%	%	%	%	l		ng	ng	ng	ng
8020	kontroll	16,5	30,37	256	84	87	92	92	1	0,21	5,6	1,12	2,7	4,7
8026	kontroll	39	30,67	200	96	99	99	96	2,25	0,12	13,8	1,95	15,4	8,1
8030	kontroll	36	27,89	168	94	96	96	95	0,81	0,28	5,6	0,78	14,3	7,3
8039	kontroll	27	28,34	172	92	95	95	90	0,47	0,16	6,1	0,69	7,8	0
8018	COPD	47,5	24,4	156	71	56	56	68	1,44	0,19	7,7	1,04	6,3	9,7
8024	COPD	62,5	27,76	178	76	58	58	78	3,3	0,2	10,5	6,69	56,5	10,8
8025	COPD	20	23,85	188	76	65	64	77	1,81	0,35	13,1	1,07	51,5	7,5
8036	COPD	57	33,87	110	62	54	68	71	0,41	0,2	9,4	1,58	65,8	6,8
8038	COPD	17,5	24,09	197	70	56	64	70	1,72	0,4	0	0,6	4,3	4,8
8040	COPD	47	36,75	216	81	68	68	84	1,14	0,36	7,3	2,04	12,5	8

4.8. táblázat: A férfi betegek antropometria és légzésfunkciós adatai, akiknél 300 ml fiziológiás só oldattal BAL-t égeztünk, a BAL lipid tartalmának a meghatározásra.

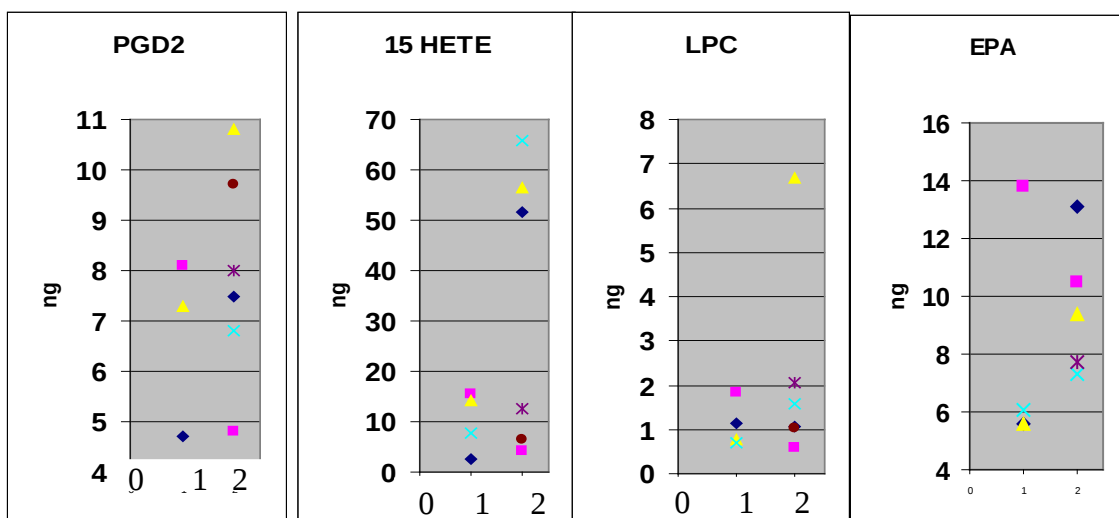
	COPD	Kontroll	p< 0.01
Életkor (év)	58.5 ± 4.43	57.50± 5.00	p< 0.01
FEV ₁	61.73 ± 5.68	95.63 ± 2.79	p< 0.01
FEV ₁ /FVC	64.10 ± 3.28	82.18 ± 1.49	p< 0.01
IVC	3.28 ± 0.16	3.86 ± 0.42	p< 0.01

4.9. táblázat: Statisztikailag szignifikánsan különbözik a COPD-ben szenvedő és a kontroll csoport légzésfunkciós paramétere.

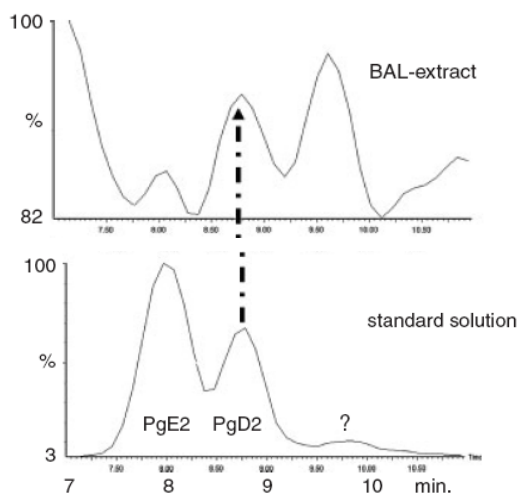
4.2.3. A BAL lipid tartalma és a légzésfunkció összefüggései

A vizsgálataink során a FEV₁, FEV₁%, PEF és TLC értékeket vizsgáltuk és szignifikáns összefüggést találtunk a BAL lipid tartalma és az előbbi légzésfunkciós paraméterek között. A statisztikai értékelést R² teszttel végeztük, és lineáris regressziós analízist is végeztünk. Annak ellenére, hogy valamennyi betegünkön azonos mennyiségű folyadékkal (300 ml) végeztük a BAL-t, változó volt a visszanyert folyadék mennyisége. A visszanyert folyadék mennyiség nem mutatott szignifikáns összefüggést BAL-ban mérhető lipid metabolitok koncentrációjával. A légzésfunkciós paraméterek közül visszanyert folyadék mennyisége a TLC-vel mutatott szignifikáns összefüggést, ami valószínűleg a betegeknek az

emfizémájával magyarázható. Az FRC-t is vizsgáltuk, de nem találtunk szignifikáns összefüggést, a lipid összetevőkkel. Az R^2 értékek az egyes lipidek és légzésfunkciós paraméterek vonatkozásában a 4. 12 táblázatban találhatók.



4.10. ábra A COPD-ben szenvedő betegek és kontrollok BAL folyadékjában mérhető lipid szintek. A teljes mennyisége a lipideknél, amelyet LC-MS módszerrel mértünk, ng-ban van megadva. (Jelmagyarázat: 1 Kontroll, 2. COPD)



4.11. ábra A HPLC-MS alap szeparálási görbe mutatja a PgE_2 és PgD_2 elválasztását, és összehasonlítást a BAL-ban mintával.

Hipotézisünk alkalmazása nélkül mind a négy vizsgált metabolit pozitív korrelációt mutatott, kettő, a PgD_2 és az EPA értékek mutatnak jó pozitív korrelációt a TLC értékekkel, azaz minél nagyobb a mért PgD_2 és EPA koncentráció, annál nagyobb a mért TLC érték. A TLC értékek viszont nem.

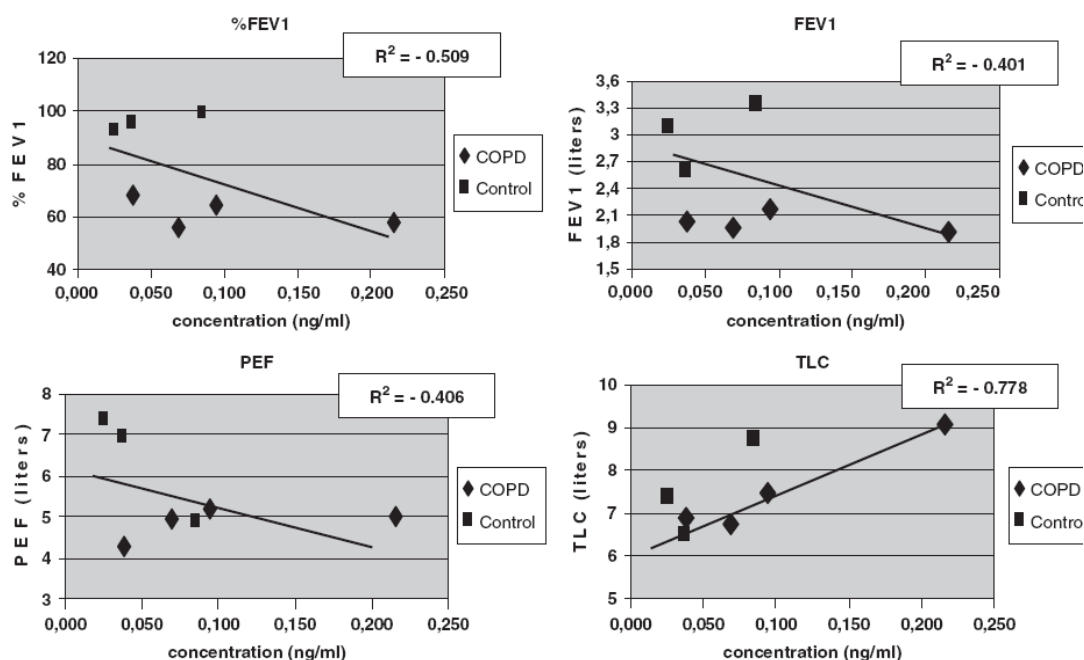
egyértelműen jellemzőek a COPD-re, annak az emfizémás komponensét lehet a TLC értékekkel jellemezni. Amennyiben hipotézisünket alkalmazzuk, és a teljes visszanyert lipid mediátor mennyiséget értékeljük, a COPD-t jellemző FEV_1 , $FEV_{1,\%}$ és a COPD-re nem jellemző PEF értékekre is kapunk korrelációt a PgD_2 -re vonatkozóan, az EPA-ra vonatkozóan pedig csak a COPD-re legjobban jellemző FEV_1 , $FEV_{1,\%}$ értékek mutatnak korrelációt. Amennyiben mért összes lipid értékeket normalizáljuk a TLC értékre a PgD_2 -re a FEV_1 , $FEV_{1,\%}$ értékek jobb korrelációt mutatnak. (4.12

		FEV ₁ %	FEV ₁	PEF	TLC
A	PgD2	-0,509	-0,401	-0,406	0,778
	EPA	-0,228	-0,228	-0,311	0,779
	LPC	-0,385	-0,386	-0,067	0,644
	15-HETE	-0,544	-0,479	-0,19	0,644

B	PgD2	-0,665	-0,647	-0,702	0,372
	EPA	-0,705	-0,628	-0,365	0,698
	LPC	-0,461	-0,403	-0,213	0,716
	15-HETE	-0,513	-0,498	-0,202	0,517

C	PgD2	-0,672	-0,771	-0,584	0
	EPA	-0,575	-0,511	-0,541	0
	LPC	-0,487	-0,443	-0,255	0
	15-HETE	-0,513	-0,504	-0,209	0

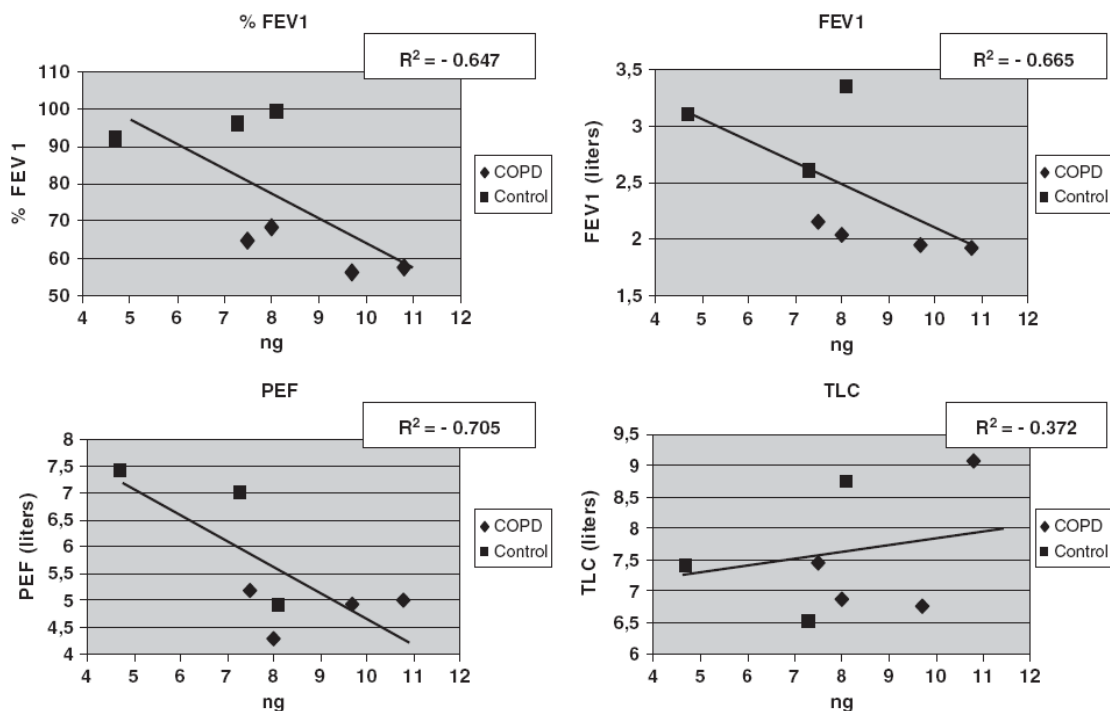
4.12. táblázat: Az R^2 értékek és a lipid metabolit koncentrációk, lipid koncentráció (A), totális lipid mennyiség (B), a TLC-hez normalizált teljes nyert lipid mennyiség (C). (A *félkövér/dőlt* szoros, statisztikailag igen szignifikáns összefüggést mutat, a *félkövér* közepesen erős összefüggést jelez, és a *dőlt* nyomtatás gyenge kapcsolatot jelöl)



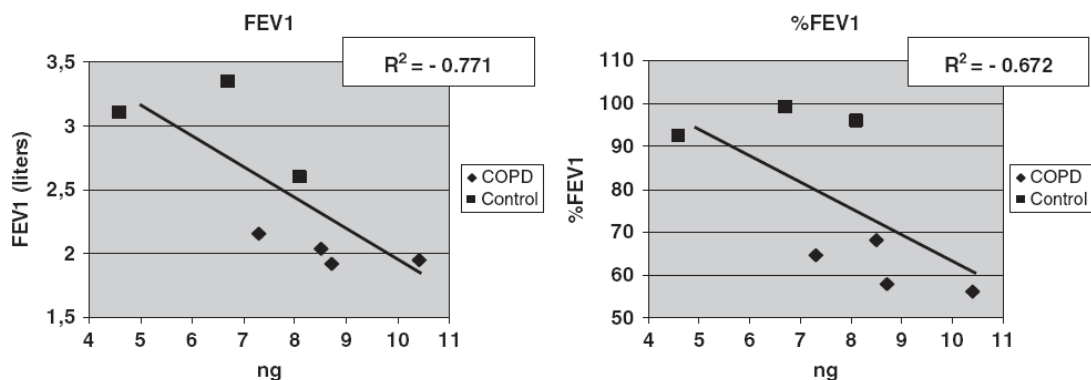
4.13. ábra: A BAL-ban mért PgD₂ koncentrációja a légzésfunkciós paraméterek függvényében. A lipid értékek azt a totál lipid mennyiséget jelölik, amit a visszanyert BAL folyadékban mértünk és lineáris regressziós analízis használtunk.

táblázat). Első lépésben, a BAL folyadékban mértük és meghatároztuk a PgD₂ koncentrációját. A 4.13-as ábrán jól látható, hogy a COPD-re jellemző FEV₁, FEV₁% és a COPD-re nem jellemző PEF értékek nem mutattak korrelációt a PgD₂ koncentrációjával. A TLC viszont, ami az emfizéma mértékének az egyik paramétere jó korrelációt mutatott a PgD₂ koncentrációjával. A következő lépésben alkalmaztuk

hipotézisünket a bevitt BAL kompartmentalizációjáról és a visszanyert BAL folyadékban, meghatároztuk a PgD₂ összes mennyiségét. A 4.14-es ábrán jól látható, hogy hipotézisünket alkalmazva most a COPD-re jellemző FEV₁, FEV₁% és a COPD-re nem jellemző PEF értékek mutattak korrelációt a PgD₂ koncentrációjával. A TLC nem mutat korrelációt a PgD₂ koncentrációjával. Végül a BAL kompetantilizációjáról alkotott hipotézisünket alkalmazva a visszanyert BAL folyadékban meghatároztuk a PgD₂ összes mennyiségét és ezt normalizáltuk a TLC-re. A 4.15-ös ábrán jól látható, hogy hipotézisünket alkalmazva most COPD-re jellemző FEV₁, FEV₁% és a COPD-re nem jellemző PEF értékek jobb korrelációt mutatnak, mint a TLC-re történő normalizáció nélkül.



4.14. ábra: A PgD₂ BAL-ban mért koncentrációja a légzésfunkciós paraméterek függvényében. A BAL-ban mért lipidek teljes mennyiségét ng-ban adjuk meg. Lineáris regressziós analízissel állapítjuk meg az összefüggést.



4.15. ábra A PgD₂ BAL folyadékban mért szintje a légzésfunkciós paraméterek függvényében, TLC-re normalizálva. A lipid értékek esetén a totál visszanyert lipid mennyiséget jelöltük ng-ban. Az adatokat lineáris regressziós analízissel értékeltük.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. A BIOMARKER KUTATÁS ÉS ALKALMAZÁSA A JÖVŐ KLINIKUMÁBAN: MOLEKULÁRIS MEDICINA

A globális proteom analízis vagy más néven proteomika, manapság népszerű terület és nagy technikai kihívást jelent. A globális molekuláris profilírozás vagy genom kutatás azt jelenti, hogy feltérképezzük egy biológiai rendszer összes elemét egészséges vagy beteg szervezet esetében. A teljes emberi genom szekvencia elérhetősége globális szinten teszi lehetővé bármilyen ismert genetikai változat tanulmányozását.

A teljes genom vagy egyes gének kifejeződésének vizsgálata akár egy kísérletben is megoldható hibridizáció alapú mRNS expressziós profilírozással, nagy mennyiségű PCR-el vagy HTS szekvenálás alapú vizsgálatokkal. A betegségek kialakulását alapvetően a génvariabilitás és a környezeti hatások együtt okozzák. A genetikai változatok ismerete felvilágosítást ad egyes betegségekre való hajlamra, de nem ad információt a környezeti hatások befolyására. A gének kifejeződését a környezet is befolyásolja, de nem magyarázza meg teljesen a biológiai változásokat, mivel az mRNS szintjén fejeződik ki és nem az adott funkciókat ellátó fehérjék szintjén. Ennek ellenére, a gén kifejeződési profilírozás és a globális genom variabilitás analízis (genom scan) bizonyíthatóan hasznos eszköz a kutatási és klinikai vizsgálatok során. Újabban több, egyesített gén kifejeződési analízisen alapuló, többváltozós vizsgálati módszert vezettek be, melyeket az FDA jóváhagyott, pl a mellrákos biopsziás minták prognosztikai tesztelését (Agendia, Mammaprint, és Oncotype Dx, Genomic Health) vagy az ovárium rák diagnosztikum (OVA1, Vermillion). Határozottan úgy tűnik, hogy a többváltozós fehérje azonosítási vizsgálatoknak kifejezetten nagy jövője van, mivel a fehérjék változásának megismerése sokkal közelebb visz az aktuális klinikai probléma megoldásához, mint az mRNS vizsgálat, mind a kutatási, mind diagnosztikai kérdésekben. A globális molekuláris technológia fejlődése elérhetővé teszi az összes gén egyenkénti szekvenálását, az expresszió minden génre és szövetre kiterjedő analízisét és rövidesen az összes metabolit és fehérje kifejeződésének a vizsgálata is lehetővé válik. A cél az, hogy az összes biológiai folyamatban szerepet játszó elem, legyen az DNS, RNS, fehérje, lipid, szénhidrát vagy egyéb metabolit egyszerre és egy lépésben mérhetővé váljon. Potenciálisan ennek a mérésnek minél inkább globálisnak kell, hogy legyen de emellett annyira érzékenynek is, hogy meg tudja különböztetni a már biológiai szempontból minimális eltérést a normálistól. Míg a ma orvosa némi mérlegelés után kiválasztja a rendelkezésre álló vizsgálatok halmazából az adott betegnek legmegfelelőbbnek tűnőt, addig a jövő orvosa a globális molekuláris diagnosztika jegyében mindent megvizsgál minden különösebb mérlegelés vagy találgatás nélkül.

A globális molekuláris diagnosztika előfutára a hipotézis nélküli biomarker kutatás. Az itt bemutatott munkámban a biomarker profilírozás proteinekét célzó vizsgálata hipotézis nélküli volt. A technológia fejlesztése után, azaz olyan módszerek kidolgozását követően, melyek az egy lépésben történő és a szükségleteknek megfelelően érzékeny mérést teszik lehetővé. A mérésből származó adatahalmaz megértése és az integrált mintázatok élettani és patológiai szempontból való kiértékelése lesz a következő lépés. Ma a DNS szekvenálás és a gén kifejeződés (pl. Affymetrix génchip technológia) kielégítik a globális diagnosztika igényeit, a fehérjék és metabolitok mérése még nem. Egyre sürgetőbbé válik az igény, hogy fejlesszük a klinikai diagnosztikát és a megállapított diagnózis alapján terápiás lépéseinket a molekuláris szinten patológiai zajló változásoknak megfelelően, alakítsuk ki (177). A biomarkerek használata segít meghatározni a beteg szövetek biológiai viselkedését és a

kezelés várható klinikai eredményét. Optimális esetben segítenek az egyéni rizikó tényezők kockázatának a meghatározásában is. Egy-egy betegség optimális markere élesen megkülönbözteti az egészségeset és a beteget. A biomarkerek emellett a betegség kezelésének várható eredményét is segíthetnek megjósolni. A protein típusú biomarkerek potenciálisan utalhatnak valamennyi sejtes típusú válaszreakcióra. Felhasználásukkal akár a személyre szabott orvoslás, a személyre adaptált kezelések a legmesszebb menőkig megvalósulhatnak. Sajnos mind ezek a potenciális lehetőségek ellenére ez idáig az átütő diagnosztikus és terápiás eredmények még váratnak magukra (178,179).

5.1.1.Fehérje biomarker kutatási technológiák: összevetés a monoklonális ellenanyag proteomikával az eredményeink fényében

A legutóbbi időkig a „standard” biomarker kutatás a kétdimenziós gélelektroforézist használta. A fehérje „foltok” melyek változott intenzitást mutattak, az elsőként megvizsgált két betegcsoport között, tömegspektrometriás „ujjlenyomat” analízissel lettek azonosítva. A módszer nem elég érzékeny és nagyüzemi módban kivitelezhetetlen (180). Ígéretes technológiaként indult a CIPHERGEN Inc. cég által bevezetett „fehérje chip” módszer, ami a SELDI és MALDI-TOF eljárást alkalmazta. A kezdeti sikerek ellenére (181) a mérések nem bizonyultak megfelelően reprodukálhatónak (főleg az erre alkalmatlan tömegspektrométer használata miatt) és a biomarkerként identifikált „fehérje csúcsok”-at sem lehetett mindig pontosan egy-egy géntermékként azonosítani (182). A késő kilencvenes években a folyadék kromatográfiával kapcsolt tömegspektrometriás (LC-MS) mérési eljárások terjedtek el. Ezekkel, sokkal több fehérjét lehetett azonosítani, mint a kétdimenziós tömegspektrometriás méréssel. Kezdetben a legtöbb kutató protein katalógusokat épített egy-egy szövetről (183) amíg nyilvánvalóvá nem vált, hogy a módszer globalitása nem kielégítő és így az adatok nem hasznosíthatóak. Ugyanakkor az is nyilvánvalóvá vált, hogy a beteget az egészséggel való összehasonlítás során hasznos biomarkerek kerülhetnek felfedezésre (184). A módszer érzékenysége növelésére az egyik mintát kis molekulával vagy izotóppal derivatizálták, ezek az ICAT és SILAC módszerek (185,186). Így viszont egyszerre csak két mintát lehet vizsgálni, a négy minta szimultán vizsgálatára alkalmas multiplex módszer az iTRAQ (187). Végül is egyik módszer sem alkalmazható jelentős eredményességgel ott, ahol a legfontosabb lenne, a vérplazma biomarkereinek felfedezésében. Ennek az oka az, hogy a vérplazma fehérjeinek nagy részét, 95%-át néhány, kb. 10-12 fehérje alkotja. A nagy mennyiségben jelenlevő fehérjék minden analitikai módszer alkalmazását gátolják, így ezeket a plazma vizsgálata előtt el kell távolítani. Az eltávolítás után is jelentős koncentráció tartományt kell lefedni az analitikai módszerekkel. Sok minta esetén a tömegspektrometrián alapuló módszerek használhatatlanok mert drágák és időigényesek, így mindenféleképpen a felfedezés után egy új assay-t kell fejleszteni. Erre a legalkalmasabb a „klasszikus” ellenanyag alapú ELISA. Itt viszont az assay fejlesztés nehézségei lassítják a folyamatot. Amennyiben az ellenanyagok „könyvtár” formában elérhetők a könyvtárak előzetes, drága eljárások nélkül is alkalmazhatók már a felfedezésben. Az ellenanyag könyvtárakon alapuló eljárásoktól sok új diagnosztikum várható (55,188).

Munkának hosszabb távú célja volt, hogy elkezdjünk egy szisztematikus fehérje biomarker kutatást a népegészségügyi szempontból egyik legfontosabb betegségben, a COPD-ben, aminek jelenleg csak tüneti kezelése lehetséges. Ez annál is inkább fontos, mivel a jelenleg érvényben levő protokollok, alapján a COPD diagnózisát csak azután tudjuk kimondani, miután a betegnél bekövetkezett az irreverzibilis légzésfunkció romlás. Emellett Magyarország vezető szereppel bír a COPD okozta halálozásban a férfiak között (7).

A hipotézismentes fehérjeproteomikai vizsgálat specifikus célkitűzése az volt, hogy igazoljuk azt a feltételezést, hogy specifikus betegségekre jellemző protein biomarkerek felfedezhetők és transzlációs szűk keresztmetszet nélkül kvalifikációra alkalmas teszt is fejleszthető egy lépésben. Nyolc hónap alatt a monoklonális antitest mediálta proteomikai megközelítésünk tíz olyan monoklonális antitest előállítását tette lehetővé, amely képes magas statisztikai szignifikanciával megkülönböztetni a normál és a COPD-ben szenvedő beteg populációt, egyszerű ELISA teszttel. Ezzel a módszerrel a humán plazmában található glikoproteinek ellen betegség specifikus monoklonális antitestet sikerült generálni. Nagyon hatékony és nagyszámú pozitív klónt eredményezett, a generált nagy monoklonális antitest könyvtárunk. Ez módszer pontosabb és gyorsabb, mint a népszerű tömeg spektroszkópia alapján történő meghatározás. A monoklonális antitest termelési stratégia a protein természetű biomarkerek felfedezésére alkalmas, és az ELISA teszt alkalmazása azonnali klinikai alkalmazást tesz lehetővé. Ez az új technológia teszi lehetővé, hogy a további klinikai kvalifikációs és validációs kísérletek után remélhetőleg gyorsabban jussunk majd a COPD korai diagnózisára, és a kezelés hatására bekövetkező változások detektálására. Emellett betegség követésére alkalmas klinikai teszthez kívánunk jutni azért, hogy a légzésfunkciós változások bekövetkezése előtt ki tudjuk mondani a COPD diagnózisát, illetve a betegség előrehaladottabb állapotában légzésfunkciós vizsgálat nélkül is nagy tömegek szűrése során diagnózishoz jussunk, és lehetőség legyen nagy populációk vérvétellel történő COPD szűrésére. A felfedezés adta lehetőséget a hétköznapi gyakorlatban való alkalmazhatóságot további széleskörű klinikai vizsgálatokban kell majd bebizonyítani. Itt az volt a cél, hogy olyan biomarkereket fedezzünk fel, amelyek szűk keresztmetszet nélkül diagnosztikumká (ellenanyag alapú teszt) alakíthatók, azért hogy a betegség stádiumától, a légzés funkciós eltérésektől függetlenül, vagy még a funkcionális romlás előtt is, képesek legyünk a COPD bekövetkeztét megjósolni, és hogy szűrhessek a rizikó csoportot. Néhány azonosított protein úgy tűnik, hogy betegség specifikus és más klinikai vizsgálatban is azonosítottak már (Pfizer/Biosystems International bizalmas adat). Annak ellenére, hogy a COPD-re specifikus monoklonális antitest jellemzésére, az antigén azonosítása, a vizsgálatban relatíve nagy számú protein találtunk, a kezdeti vizsgálat korai sikere azt sugallta, hogy ez a módszer egy hatékony megközelítés a gyors monoklonális antitest sorozat generálásához.

A protein biomarker vizsgálatokkal kapcsolatos célkitűzéseink és kérdéseink közül mindet megvalósítottuk, illetőleg pozitív eredménnyel tudunk megválaszolni:

I/1: A humán plazma tartalmaz COPD-re specifikus fehérje biomarkereket.

I/2: A bemutatott kísérleti eredmények alapján a biomarkereink alkalmasak a dohányos (de nem COPDs) és a dohányos COPDs betegek elkülönítésére. A későbbiekben ezt további kvalifikációs és validációs vizsgálatokban tervezzük megválaszolni. Eredményeink alapján racionális alapon új kísérleteket tudunk tervezni, melyek az eddig felfedezett fehérje biomarkerek klinikai jelentőségét fogják tisztázni. Pontosabban, eredményeink elegendő statisztikai alapot nyújtanak ahhoz, hogy a következő vizsgálatok statisztikai erejét meg tudjuk becsülni és így konkluzívabb klinikai eredményekhez jussunk.

I/3: A fentiek alapján a monoklonális ellenanyag proteomikán alapuló módszerünket szélesebb körben történő alkalmazásra is jónak tartjuk

Az utolsó pont alátámasztása érdekében módszerünket a következő alfejezetben összevetjük a ma használt és leggyakrabban alkalmazott proteomikai biomarker felfedezési technológiákkal.

A legnépszerűbb proteom kutatási módszerek során tömeg spektrométert használnak. Ezek legnagyobb

hátránya, még ha alkalmanként meg is határoznak lehetséges diagnosztikai jelölő anyagokat, akkor is felfedezést nehéz klinikai vizsgálatokká alakítani. Mikor egy jelölő fehérjét tömeg spektrométerrel azonosítanak, ellenanyagon alapuló vizsgálatot kell fejleszteni. Ezek a vizsgálatok aztán ritkán reprodukálják az eredeti eredményt és a kifejlesztésük is nehéz. A klinikai vizsgálatok jelölő molekuláira végezzük el a validálást, melyeket az mAB alapú módszerrel fejlesztünk ki. Az alábbi összehasonlító 5.1 táblázat, pedig a monoklonális ellenanyag proteomikai technológia előnyeit demonstrálja.

Ellenanyagot használó biomarker kutatási stratégiák	Előny	Hátrány	Könnyű kapcsolódás a klinikai assay-khez
Monospecifikus ellenanyagok	Skálázhatóság	A teljeskörűség kérdéses, poliklonális ellenanyagok reprodukálhatósága, PTM-re való érzéketlenség	Igen
Rekombináns ellenanyag és fág	Teljeskörűség	Skálázhatóság szűrés szinten, affinitás	Nem
mAb könyvtárak komplex természetes antigéneje ellen	Érzékenység, skálázhatóság	Nem teljes körű, fehérje azonosítás hiányzik, alacsony szinten jelenlevő fehérjéket nem látja, néhány ellenanyag lehetséges, hogy nem működik denaturált antigéneken	Igen

5.1 táblázat: A monoklonális ellenanyag proteomikai technológia előnyeit demonstrálja

A monoklonális ellenanyagot azután jellemzik, hogy meghatározzák a rokon fehérjék azonosítóját, a BSI egyik szabadalmi oltalom alatt álló technológiájával. Egy másik eljárásban meghatározzák a rokon peptid szekvenciát bakteriofág „display” vagy bemutató technológiával (Targetex RT.-vel együttműködve). Ez a módszer az ellenanyag jellemzésének része. Az affinitás kromatográfiás módszeren alapuló fehérjeazonosítás elengedhetetlen lépés. A bakteriofág kísérletből származó peptidok összesített (consensus) szekvenciája jellemzi az ellenanyag antigén kötő zsebet, mint mimetop. Ezt az összesített mimetop szekvenciát sem, az egyes fágokból származó peptid szekvenciákat sem tartják, jellemzőnek az „igazi” epitopra, miután ez az esetek túlnyomó többségében nem lineáris, hanem háromdimenziós és emiatt jelentősen függ a fehérje konformációjától (a lineáris szekvencia ettől nem függ). Mindennek ellenére a potenciális lineáris peptid epitópokat lefuttatják a DNS és fehérje adatbázisokon, az esetleges keresztreakciók, és a ritka lineáris epitópok felfedezésére. Az mAB-ok további jellemzésére, az IgG nehézlánc hipervariábilis régiójának cDNS szekvenciáját is meghatározták. Egy modellként szolgáló esetben ezt in-silico „dokkolási” kísérletekben megpróbálták felhasználni proteinidentifikálásra a mimetop szekvenciák ismeretében.

Ma több mint 1000 klónozott ellenanyag áll a BSI rendelkezésére. Az ellenanyag könyvtárak az egyes fehérjék szintjén fedik a legimmunogénebb 500 ng/ml –nél nagyobb koncentrációban jelenlevő kb. 100 plazma fehérjét. Azaz, legalább egy, de leggyakrabban több monoklonális ellenanyag áll rendelkezésre minden fehérje ellen. Az egyes fehérjék epitopjait tekintve a telítéstől távol állnak, bár néhány fehérje ellen több mint 10 eltérő ellenanyaguk is van. A rendelkezésre álló könyvtár segítségével az epitópok

dinamikáját lehet vizsgálni, ez az eddigi kísérletek alapján, COPD, obesitas, tüdő, mell és vastagbél rák esetében is jellemzően változik. A változás oka valószínűleg eltér a várt okoktól, azaz attól, hogy a beteg szerv, pl. a rákszövet termel specifikus fehérjét. A feltételezés az, hogy a patológias folyamatok velejárójaként a vérfehérjét szintetizáló szövetek, leginkább a máj, patológias körülmények között, pl. gyulladás hatására megváltozott másodlagos modifikációval (pl. glikoziláció) ellátott fehérjét, vagy azok variánsait állítja elő. A sztohiometria is változik, egyes nagy abundanciájú fehérjéből többet, másból kevesebbet tartalmaz a vér bizonyos betegségekben. Mindennek az eredő hatása az, hogy a detektálható epitopok minőségileg is, mennyiségileg is megváltoznak. A BSI ellenanyag könyvtára valószínűleg mindezt detektálni képes, ellentétben más, pl. tömegspektrometriás eljárásokkal.

Fontos megjegyezni, hogy a kompetitív mérésen alapuló eljárást, melyet biomarker felfedezésre először a dolgozat témájával kapcsolatos cikkünkben közöltünk a BSI (BioSystems International SAS) azóta „nagyüzemi” módon is validálta. A Randox Ltd, gyártja azt a QuantiPlasma biocshipet, ami a fent leírt gátlási elven alapszik (<http://www.randox.com/quantiplasma-array.php>), és amivel a DEOEC Klinikai Kutató csoportja a BSI-vel kollaborálva tüdő rákosokat és más rákosokat is sikerrel vizsgált. A kezdeti minőség biztosító és reprodukálhatósági vizsgálat eredményeit rövidesen közölni fogják. Terveink között szerepel, a hogy a Randox platformon futtatható QuantiPlasma biocshipet, az értekezésben leírt vizsgálatok eredményeire támaszkodva használjuk majd COPD differenciál diagnózisára.

5.2 LIPID BIOMARKER VIZSGÁLAT

A lipid metabolit vizsgálat hipotézis által vezérelt volt, azért mert a lipidek vagy a teljes metabolom globális vizsgálata ma még lehetetlen egy lépésben. A metabolom nagyobb, fontosabb részeinek vizsgálatát is csak igen költségesen lehet kivitelezni, ezért hipotézis által vezérelt elvekre helyeztük a további kísérleteinket. A kísérlet első lépésében célzottan kiválasztottunk néhány biológiailag aktív lipid metabolitot, olyanokat melyek a komplex lipid metabolizmus és patológia szempontjából fontosnak látszottak és viszonylag könnyen detektálhatóak; pl. létezik ELISA-teszt mérésükre vagy az MS-sel történő mérés nem komplikált. Miután az így kiválasztott mediátorok száma nem túl nagy, azt tűztük ki célul, hogy a patológiai folyamatokban való részvételüket is jobban megközelítjük, (funkcionális kvalifikáció) oly módon, hogy a COPD kórfolyamatainak a „színhelyéről” veszünk mintát, és megvizsgáljuk, hogy a mért szintek korrelálnak-e a COPD súlyosságával.

Jelen, hipotézis vezérelt biomarker vizsgálatunkban a biológiailag aktív membrán-foszfolipidból származó lipidek közül néhány intermediér prekursor és a PgD_2 -t mint a jól ismert aktivitással rendelkező prosztaglandint vizsgáltuk. COPD-ben szenvedő betegek, és dohányos kontrollok BAL folyadékában mértük mennyiségüket, kvantitatív tömegspektrometriás módszerrel. Első megközelítésben a relatív invazív BAL módszerével próbáltunk adatokat nyerni a lipid metabolitok megoszlásáról a bronchoalveoláris térben, amely a COPD patomechanizmusának a színtere. Ezt a megközelítést azért választottuk, mert a biológiai kvalifikáció lehetősége így jobb, egyrészt, mert a patológias folyamat színhelyéről vesszük a mintát, másrészt, pedig azért, mert a szelektált lipidekkel és a COPD-vel kapcsolatban több releváns adat is ismert. Igazoltuk, hogy a lipid metabolitok jelen vannak mérhető mennyiségben a bronchoalveoláris lavage-ban, és mennyiségük összefüggést mutat a légzésfunkciós paraméterekkel. Ez a vizsgálat igazolta azt a feltételezést, hogy a lipid biomarkerek szintje és a légzésfunkciós eltérések között összefüggés van, különösen a COPD korai fázisaiban, mint

pl. a GOLD COPD 2 stádiuma.

Annak ellenére, hogy a mintaszám relatíve kicsi volt, nagyon jó negatív korrelációt tudtunk bizonyítani a TLC-re vonatkozóan a PgD₂ és az EPA BAL-ban mért szintje között, de az LPC és a 15-HETE is jó korrelációt mutatott tömegspektrometriás vizsgálat során. A BAL vizsgálatok minden esetben kis esetszámú vizsgálatok, mert maga a BAL igen kockázatos, és invazív vizsgálatnak számít. A korreláció pozitív volt, tehát minél nagyobb a TLC értéke annál nagyobb koncentrációkat észleltünk. A TLC az emfizéma mértékével volt arányos. Fontosabb, hogy a COPD-re jellemzőbb FEV₁%, FEV₁ és COPD-re nem jellemző PEF értékekkel nem kaptunk így korrelációt. Ugyanakkor, ha figyelembe vettük hipotézisünket a BAL folyadék kompartmentalizációjáról jó és a közölt biológiai adatokkal összhangban levő korrelációt kaptunk a PgD₂-re és az EPA-ra vonatkozóan. Megfigyelésünk szerint a kompartmentalizációt figyelembe véve az összes visszanyert PgD₂ és EPA mennyiség és a FEV₁% illetőleg az FEV₁ között jó negatív korreláció van, azaz minél kisebb az FEV₁ és a FEV₁% annál több PgD₂-t és EPA-t találtunk a visszanyert BAL folyadékban. A PgD₂-re vonatkozóan a korreláció javult, ha a TLC-re normalizáltuk az értékeket. Mindez összevág az alveoláris neutrofil és CD8⁺ limfocitákra vonatkozó megfigyelésekkel. Mindkét sejttípus annál nagyobb számban detektálható az alveolusban minél kisebb a FEV₁ és a FEV₁% (80,87).

Számos különböző gyulladásos mediátorról tudjuk, hogy szerepet játszik a COPD kialakulásában, mint például a lipidek nagy száma, a kemokinek és a cytokinek (lásd **2.3 FEJEZET**). Számos esetben hasonló patomechanizmus zajlik le a COPD és az asztma esetén, de ezek a folyamatok számos esetben egyéniek és számos folyamat erőteljesen különbözik a két kórképben. A COPD esetén a makrofágok, neutrofilok és a CD8⁺ T-sejtek játszanak meghatározó szerepet, míg az asztmás gyulladás esetén a legfontosabbak az eozinofilek és a hízósejtek és CD4⁺ lymphocyták, amelyek az allergiás fenotípust jelképezik.

A prostaglandinok mind az asztma, mind a COPD patofiziológiájában meghatározó szerepet játszanak. COPD esetén a PGE₂-re érdemes fókuszálni, mivel ennek az emelkedett szintjét már kimutatták COPD-s betegek kilégzési kondenzátumában is. A PGE₂ úgy tűnik, hogy szerepet játszik mind a protektív, mind a romboló funkciókban a COPD patomechanizmusában. Egyik oldalról bronchodilatátor szerepe van és fokozza foszfodiesteráz-4 gátlóknak a hatását, másik oldalról, pedig aktiválja a mucin gén expresszióját, érzékenyíti és aktiválja a légutak szenzoros idegvégződéseit, így a fokozza a köhögést. Asztma esetén a legfontosabb prosztoglandin természetű gyulladásos mediátor a PgD₂ amelyet, a hízósejtek termelnek IgE kötődés hatására kialakuló aktiválódás esetén, és így vezetnek hörgőszűkülethez, és segítik az eozinofilek és a CD4⁺ T-sejtek toborzását a tüdőbe. Annak ellenére, hogy széles körben vizsgálták a hízósejtek szerepét asztma bronchiáléban, ma már nyilvánvaló tényekkel bizonyított, hogy szerepük van a COPD kialakulásában is, amit bronchiális biopsziák immunhisztokémiai vizsgálata során igazolták, hogy tünetmentes dohányosoknál szignifikánsan nagyobb számban található hízó sejtek a közepes bronchusok epitéliumjában, a simaizmok között és a lamina propriában, mint a nem dohányzóknál. Továbbá nagyobb számú hízó sejt található a dohányos COPD-s betegek bronchiális epitéliumban, mint a tünetmentes dohányosokéban. Ezt pulmonectomiás specimenekből végzett cytológiai vizsgálattal igazolták. Végül a COPD-s betegek hypertóniás sóoldattal történő provokációja bronchoconstrictiohoz, és a tüdő hiperinflációjához vezet, ami jó korrelációt mutat az indukált köpet emelkedett hisztamin értékével, ami egyértelműen a hízó sejtek szerepére hívja fel a figyelmet. Mindent összevetve, ezek az adatok azt sugallják, hogy a hízó sejtek jelen vannak a COPD-s és dohányos betegek légútjaiban. A mi adataink szintén a hízó sejtek jelenlétére

utalnak a COPD-s betegek légútjaiban, és ez egybe vág az észlelt emelkedett PgD_2 szinttel BAL folyadékban, amit munkacsoportom bizonyított először itt. Fontos megjegyezni, hogy COPD-s betegek kilégzett levegő kondenzátumában már vizsgálták a PgD_2 -t de nem találtak eltérést a kontrollhoz képest (189). Ugyanakkor a PgD_2 receptorok felismerése (PD1 és PD2) és a bronchoalveoláris tér infiltrátumának létrejöttére vonatkozó adatok (135) (lásd a 2.3.5. *Lipid mediátorok fejezetet*) felkeltették az érdeklődést a PgD_2 -re vonatkozóan a COPD-ben is. Néhány hónappal közleményünk megjelenése után és a mi klinikai kísérletes adatainkra hivatkozva az Amira Pharmaceuticals cég közölte, hogy a COPD egér modelljében szelektív PgD_2 receptor antagonistá adagolásával csökkenthető a bronchoalveoláris térből kimosható makrofágok, neutrofilek és limfociták száma (110). A PgD_2 receptor antagonisták fejlesztésére ezután igen erős figyelem fordult a gyógyszeriparban (190,191). A PgD_2 -re vonatkozó eredményeim további igazolása nagyobb beteganyagon új lehetőséget teremthet a COPD kezelésében, különös tekintettel a PgD_2 hatás gátlása a PgD_2 receptoron keresztül.

Érdekes, hogy a várakozásunkkal ellentétben a viszonylagosan „intermediér” prekursor/mediátor lipidek az LPC és a 15-HETE nem mutatott korrelációt a COPD specifikus légzésfunkciós eltérésekkel. Az LPC-re vonatkozóan, pedig közölték, hogy szerepe lehet a granulocyták tüdőbe áramlásában (136, 137). A 15-HETE-re vonatkozóan, pedig az asztma mechanizmusokban bizonyított és a PPAR γ genetikai asszociáció miatt vártuk hogy korrelációt találunk (76,143).

A BAL kompartmentalizáció modellünk alapján úgy tekinthető, hogy a bejuttatott folyadék mennyisége kétféle oszlik, az egyik fele visszanyerhető és a másik fele nem nyerhető vissza. Az első csoport a visszanyerhető folyadékmennyiség, amely elérte a cél szövet környezetét, a szöveti környezetből számos metabolittal egyéb alkotórészekkel is gazdagodik és értékelhető mértékben közel egyensúlyi állapot alakul ki az oldékony, illetőleg „kimosható” metabolitok esetén a szövet és a BAL folyadék között. A folyadék visszanyerhető része valószínűleg a nagy és a közepes méretű hörgők felszínéről „lemosható” váladékot képviseli, azt a területet, ahol a gyulladásos hisztopatológiai folyamatok játszódnak. Következésképpen feltételezésünk szerint a teljes mennyiségű visszanyert folyadékban található összes lipid mennyiség és nem a visszanyert BAL-ban levő metabolit koncentrációja az, ami összefüggést mutat majd a funkcionális paraméterekkel. Azaz a BAL folyadék vissza nem nyerhető része nem hasonlítható össze a visszanyerhető folyadékkal. A nem visszanyerhető folyadékrész a bronchoalveolaris régiót reprezentálja és inkább a TLC értékekkel, azaz emfizéma mértékével hozható inkább összefüggésbe. Valószínű, hogy a BAL nem visszanyerhető része gyorsan felszívódik a bronchoalveolaris térből. A nem visszanyerhető rész mennyiségének változékonysága individuális eltéréseket mutathat, mert a visszanyert folyadékmennyiség egyedenként jelentős ingadozást ad. A BAL mosó folyadék reabsorpciója széles körben szór, ez részben a BAL technikából is adódhat, valamint pl. a beteg hidráltási állapotától, és az aktuális izotóniás oldattal (BAL mosófolyadék) szembeni permeabilitásból is függhet. A jelentős egyéni variáció fontos faktor és nem meglepő. Feltételezzük tehát, hogy ha a mosófolyadék eléri az alveoláris teret és a nagy felszínen való eloszlás miatt itt gyors, de egyéni variációt mutató reabszorpció indul meg, ami csak a vízre és az izotonicitást biztosító sókra vonatkozik. Kísérleteink egyik váratlan eredménye, a BAL folyadék kompartmentalizációjára vonatkozó hipotézis, melynek helyességét a PgD_2 -re vonatkozó eredmények erősen alátámasztják.

A hipotézis vezérelt biomarker vizsgálatokkal kapcsolatos célkitűzéseink és kérdéseink közül mindet megoldottuk illetőleg pozitív eredménnyel tudtuk meg válaszolni:

II/1: A humán BAL tartalmaz COPD specifikus lipid biomarkereket.

II/2: A biomarkerek közül a PgD₂ mennyisége – jól korrelál a COPD specifikus légzésfunkciós paraméterekkel

III/3: Eredményeink a biológiai kvalifikáció követelményeinek megfelelnek amennyiben eredményünk az ismert klinikai és kísérletes adatok alapján nem meglepő és alátámasztja azt a feltételezést, hogy a COPD obstruktív komponense az asztmához hasonló patomechanizmussal fejlődik ki.

Kiemelendő, hogy munkám dokumentálhatóan egyik kiindulópontja lett a PgD₂ receptor (PgD₂ receptora) gátlószer fejlesztésnek a gyógyszeriparban. (Ez remény volt, de nem célkitűzés).

II/4: Váratlan új hipotézisünk a BAL kompartmentalizációjáról jól illusztrálja a biomarker kutatás jelentőségét.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Előzmények: A krónikus obstruktív légúti betegség (COPD) az egyik vezető tényező a mortalitási és morbiditási statisztikákban világszerte. A COPD egy progresszív légúti áramlás korlátozottsággal jellemzett kórkép, ahol a légúti obstrukció nem teljesen reverzibilis. A légúti áramláskorlátozottság progresszív és a tüdőnek a kóros gyulladáshoz való reakciójával magyarázható. A COPD diagnózisát a betegség tünetei és a spirometriával mért légzésfunkciós eltérések alapján tudjuk kimondani. A COPD-t általában előrehaladott stádiumban diagnosztizáljuk. A dohányosoknak csak 15-20 %-ban (vagy gyakrabban) alakul ki COPD, és a COPD-s betegek 85-90 %-a dohányzik, ami felveti annak a lehetőségét, hogy genetikai tényezők is meghatározó szerepet játszanak a COPD kialakulásában. COPD biomarkerek felfedezése segíthet a tünetmentes COPD-s és dohányosok szűrésében, és új terápiás célpontokat jelölhet ki, és segíthet a betegek kiválasztásában, akiket korai kezelésben lehet részesíteni.

A vizsgálat célja: Munkám hosszabb távú célja az, hogy hipotézis nélküli és hipotézis által vezérelt biomarker kutatással elősegítsem egy új, diagnosztikus panel felfedezését, kvalifikációját és validációját. Specifikus kérdésem, hogy találunk-e a plazmában olyan fehérje biomarkereket amelyek, megkülönböztetik a dohányos (de nem COPD-s) és a dohányos COPD-s betegeket, potenciálisan alkalmas-e a módszer a veszélyeztetett dohányosok kiszűrésére. Munkám további célja, hogy a relatíve elhanyagolt metabolom biomarker vizsgálatot is bevezessem a COPD kutatásban. Erre vonatkozó kérdéseim: Korrelálnak-e a lipid biomarkerek a COPD-re specifikus légzésfunkciós paraméterekkel? Alkalmazható-e a hipotézis vezérelt metabolom kutatás új markerek felfedezésére és kvalifikációjára?

Eredmények, megbeszélés:

Szérum – protein – biomarkerek: Vizsgálatunkban meghatároztunk és alkalmasnak találtunk egy széleskörű monoklonális ellenanyag könyvtárakon alapuló proteomikai módszert, amely képes betegségspecifikus biomarkerek előállítására. Az új módszerrel felfedezett tíz biomarker közül négyet mutattam be. Az új marker ellenanyagok a vizsgált klinikai kohorszban COPD specifikusnak bizonyultak. A módszer transzlációs szűk keresztmetszet nélkül biztosítja a klinikai tesztek fejlesztését. Ebből a szempontból vizsgálva módszerünk egy lépésben megvalósítja a felfedezést az új biomarkerek kvalifikációjának egy fontos elemét szemben a tömegspektrometriával vagy biológiai alapú hipotézis vezérelt stratégiákkal. Az itt először leírt „gátlási” teszt általánosabban alkalmazható változata a QuantiPlasma biocsip már forgalomban van, amelyet a Biosystems International és a Randox cégek közösen fejlesztettek, és a DEOEC Klinikai és Molekuláris Medicina Laboratóriumában sikerrel került kipróbálásra.

BAL – lipid – biomarkerek: Bizonyítottuk elsőként, hogy a BAL-ban található néhány lipid biomarker (EPA, 15-HETE, LPC, PgD₂) LC-MS-sel mérhető szintje és TLC (Total Lung Capacity) között egyenes arányosság van. A BAL-ból visszanyert folyadékban található PgD₂ összes mennyisége, lineáris de fordított összefüggést mutat a COPD-re specifikus légzésfunkciós értékekkel (FEV₁, FEV₁%), a BAL kompartmentalizációjára vonatkozó hipotézisünk alkalmazása után. Kiemelendő, hogy munkám dokumentálhatóan az egyik kiindulópontja lett a PgD₂ receptor gátló gyógyszerfejlesztésnek. A BAL kompartmentalizációjára vonatkozó hipotézisünk szerint a bevitt víz egy variábilis része gyorsan felszívódik, de a kimosott mediátorok nem szívódnak fel. Az itt elsőként közlésre került hipotézisünk helyességét nagymértékben támogatja a kapott eredmény és annak irodalmi reprodukciója. A biomarker vizsgálat eredményei alapján a munkát tovább tervezem folytatni különös tekintettel a PgD₂ és COPD kapcsolatára.

6.1 SUMMARY

BIOMARKER CANDIDATES CORRELATE WITH LUNG FUNCTION IN COPD.

Background: Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a major cause of morbidity and mortality worldwide. COPD is characterized by progressive development of airflow limitation that is not fully reversible. The airflow limitation is usually both progressive and associated with an abnormal inflammatory response of the lungs. Diagnosis of COPD is built on symptoms and decreased level of lung function as tested by spirometry. COPD patients are usually diagnosed only when the disease is already in an advanced stage. Only about 15-20% (or more) of smokers are susceptible to developing COPD, and 85-90% of COPD patients are smokers, indicating the possibility of additional, genetic factors playing role the development of COPD. Identification of biomarkers result in the eventual development an early diagnostics for the asymptomatic COPD patients and for screening of smokers with high susceptibility to develop COPD. Here, I present the first phase of the work.

The aim of the study: The long term goal of my hypothesis free and hypothesis driven biomarker research is to enable the discovery, qualification and validation of an analyte panel based new laboratory diagnostics. My specific questions (protein biomarkers): Does the plasma proteome contain COPD specific biomarkers? Do we find protein biomarkers capable to discriminate smoking but COPD free subjects from smoking COPD patients? Additional goal of my work was to explore and introduce the less popular metabolom studies in COPD research. First we examined whether bronchoalveolar lavage fluid obtained from the site of the pathology, as the „direct imprint” of the disease process is applicable in the quest for lipid biomarkers? Specific questions on this subject: Do we find COPD specific lipid mediators in the BAL fluid with targeted hypothesis driven biomarker research? Is the hypothesis driven metabolom marker research applicable for the discovery and qualification of new markers in COPD?

Result and discussion:

Serum – protein – biomarkers: Based on our studies, we find the monoclonal antibody library based proteomics technology suitable for the discovery of disease specific biomarkers. We show four antibody biomarkers from the pool of ten we discovered with this technology. The monoclonal antibody biomarkers were found COPD specific on he cohorts we used. The new technology ensures the development of clinical laboratory tests without apparent bottleneck in contrast to MS based or targeted, hypothesis mediated technologies. From this point of view our technology achieves discovery and early validation in one step. The inhibition test we present here for the first time, in a more generally applicable form has been marketed as QuantiPlasma biochip, which was developed by Biosystems International and Randox and has been tested succesfully at the Clinical and Molecular Laboratory of DEOEC.

BAL – lipid – biomarkers: We demonstrate for the first time that in the BAL a few lipid biomarkers (EPA, 15-HETE, LPC, PgD₂) quantified by LC-MS technology show an apparently good and positive linear correlation with TLC (Total Lung Capacity). The total PgD₂ , quantity recovered from the BAL fluid showed good linear but inverse correlation with COPD specific lung function tests (FEV₁ and FEV₁%) after applying our hypothesis on the compartmentalisation of BAL fluid. Important that my work as evidenced from recent publications became one of the starting points for the development of PD₂ inhibitors at the pharma industry. According to our new hypothesis on he BAL compartmentalisation, the a variable part of the BAL fluid is reabsorbed quickly, however the washed-out lipid biomarkers are not reabsorbed. The hypthesis published here first is likely to be valid as supported strongly by the quality of the results. We plan to continue the qualification of the lipid biomarkers with special focus on PgD₂ and its involvement in COPD.

7.1 IDÉZETT KÖZLEMÉNYEK

1. <http://www.goldcopd.org/guidelines-global-strategy-for-diagnosis-management.html>
2. Shapiro S.D., Reilly J.J.J., Rennard S.I. Chronic Bronchitis and Emphysema. In: Mason R.J., Martin T.R., King T.E., és mtsai (eds.). *Nadel Textbook of Respiratory Medicine*, Vol. I. Saunders, Philadelphia 2010; 919–967.
3. Viegi G, Pistelli F, Sherrill DL, és mtsai: Definition, epidemiology and natural history of COPD. *ERJ*, 2007; 30: 993–1013.
4. European Respiratory Society/European Lung Foundation. *European Lung White Book. The First Comprehensive Survey on Respiratory Health in Europe*. Loddenkemper R, Gibson GJ, Sibille Y, eds. Sheffield, ERSJ, 2003.
5. Fukuchi Y, Nishimura M, Ichinose M, et al. COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study. *Respirology* 2004; 9:458–465
6. COPD prevalence in 12 Asia-Pacific countries and regions: projections based on the COPD prevalence estimation model. *Respirology*. 2003;8:192-8
7. Anto J.M., Vermeire P., Vestbo J., és mtsai: Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. *ERJ*, 2001;17:982-994.
8. C. Raheerison, P. O. Girodet: Epidemiology of COPD. *Eur Respir Rev* 2009;18:213–221
9. Mathers CD, Loncar D (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 3(11): e442. doi:10. 1371/journal.pmed.0030442
10. Gershon AS, Warner L, Cascagnette P, és mtsai: Lifetime risk of developing chronic obstructive pulmonary disease: a longitudinal population study. *Lancet*. 2011;378:991-996.
11. Viegy G, Scognamilio A, Baldacci S és mtsai: Epidemiology of chronic pulmonary disease (COPD). *Respiration*, 2001; 68: 4-19.
12. Murray CJL, Lopez AD. Evidence-based health policy-lessons from the Global Burden of Disease Study. *Science* 1996; 274:740-743.
13. Rennard S, Vestbo J.:COPD: the dangerous under estimated of 15%. *Lancet* 2006; 367:1216-1219.
14. Mathers CD, Loncar D (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 3(11): e442. doi:10. 1371/journal.pmed.0030442
15. Strausz J, Böszörményi Nagy Gy, Csekeő A, és mtsai: A pulmonológiai intézmények 2010 évi epidemiológiai és működési adatai. *Korányi Bulletin* 2011. 1
16. Szabó T.: Háromszázezer ismeretlen betegért a COPD-ről. *Magyar Orvos* 2006, 14: 23-26.
17. Somfay A, Jeney E: Spirometriás szűrés COPD-ben országos reprezentatív minta alapján. *Med. Thor.* 2006;59:2-6.
18. Böszörményi Nagy Gy.: A krónikus obstruktív légúti betegség (COPD) diagnosztikája és kezelése, *Med. Thor* 2006; 57:157-170.
19. Vastag E.:A COPD klinikai és funkcionális jellemzői, diagnosztizálása, prognózisa, *Háziorvos Továbbképző Szemle* 1996;1: 196-198.
20. Károlyi A.: Krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), *Orvosi Hetilap*, 2001;142: 2.
21. Hurd S: The impact of COPD on lung health worldwide: *Chest*. 2000;117:1S–4S.
22. Behrendt CE. Mild and moderate-to-severe COPD in non-smokers. Distinct demographic profiles. *Chest* 2005; 128:1239-44.
23. Anthonisen NR, Connett JE, Murray RP. Smoking and lung function of Lung Health Study participants after 11 years. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166:675-9.
24. Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, és munkatársai. An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J respir Crit Care Med* 2010;182:693-718.
25. Lamprecht B, McBurnie MA, Vollmer WM, és munkatársai. COPD in never smokers: results from the population-based burden of obstructive lung disease study. *Chest* 2011; 139:752-63.
26. Barker D.J., Godfrey K.M., Fall C. és mtsai: Relation of birthweight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease. *BMJ* 1991; 303: 671–675.
27. Silverman EK, Weiss ST, Drazen JM, és mtsai. Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *AJCCM*. 2000;162:2152–8
28. M. Foreman, L. Zhang, J. Murphy, és mtsai: Early-Onset Chronic Obstructive Pulmonary Disease Is Associated with Female Sex, Maternal Factors, and African American Race in the COPD Gene Study *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2011; 184: 414-420.
29. Foreman MG, Zhang L, Murphy J, és munkatársai. Early-onset chronic obstructive pulmonary disease is associated with female sex, maternal factors, and African American race in the COPD Gene Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:414-20.
30. Silverman EK, Weiss ST, Drazen JM, és munkatársai. Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Crit Care Med* 2000;162:2152-8.
31. López Varela MV, Montes de Oca M.: Variability in COPD: The PLATINO Study Viewpoint. *Arch Bronconeumol*. 2012;48(4):105–106
32. McCloskey SC, Patel BD, Hinchliffe SJ, Reid ED, Wareham NJ, Lomas DA. Siblings of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease have a significant risk of airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1419-24.
33. Pillai SG, GE D, Zhu G, Kong X, Shianna KV, Need AD és munkatársai. A genome-wide association study in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of two major susceptibility loci. *PLoS Genet* 2009;5:e1000421.
34. Repapi E, Sayers I, Wai LV, és munkatársai. Genome-wide association study identifies five loci associated with lung function. *Nat Genet* 2010;42:36-44.

35. Foreman MG, Zhang L, Murphy J, és munkatársai. Early-onset chronic obstructive pulmonary disease is associated with female sex, maternal factors, and African American race in the COPDGene Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:414-20.
36. Silverman EK, Weiss ST, Drazen JM, és munkatársai. Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Crit Care Med* 2000;162:2152-8.
37. Todisco T, de Benedictis FM, Iannacci L, és munkatársai. Mild prematurity and respiratory functions. *Eur J Pediatr* 1993;152:55-8.
38. Barker DJ, Godfrey KM, Fall C, Osmond C, Winter PD, Shaheen SO. Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease. *BMJ* 1991;303:671-5.
39. Stern DA, Morgan WJ, Wright AL, Guerra S, Martinez FD. Poor airway function in early infancy and lung function by age 22 years: a non-selective longitudinal cohort study. *Lancet* 2007;370:758-64.
40. Crothers K HL, Goulet JL, Goetz MB, Brown ST. HIV infection and risk for incident pulmonary diseases in the combination antiretroviral therapy era. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:388-95.
41. Lam KB, Jiang Cq, Jordan RE, és munkatársai. Prior TB, smoking, and airflow obstruction: a cross-sectional analysis of the Guangzhou Biobank Cohort Study. *Chest*;137:593-600.
42. Jordan TS, Spencer EM, Davies P. Tuberculosis, bronchiectasis and chronic airflow obstruction. *Respirology* 2012;15:623-8.
43. World Health Report. Geneva: World Health Organization: <http://www.who.int/whr/2000/en/statistics.htm>;
44. ATS. Chronic bronchitis, asthma and pulmonary emphysema: statement by the Committee on Diagnostic Standards for non Tuberculous Respiratory Diseases. *ARRD* 1962; 5:762 –768
45. Morgagni JB. The seats and causes of diseases investigated by anatomy. London: Millar 1769;1:361 Hafner Publishing. (in: Rooke GB.: The pathology of byssinosis. *Chest*. 1981;79:67S-71S)
46. Nas Es, Brisco WA Courmand A: The relationship between clinical and physiological findings in chronic obstructive disease of the lungs. *Med Thorac*. 1965;22:305-27.
47. Brisco WA: The variability of behavior within the emphysematous lung. *ARRD*. 1959;80:136-7.
48. Snider GL, Kleinerman J, Thurlbeck WM, és mtsai: The definition of emphysema: report of a National Heart, Lung and Blood Institute, Div. of Lung Diseases, Workshop. *ARRD* 1985;132: 182–185.
49. Han M.K, Agusti A, Calverley PM, és mtsai: COPD Phenotypes: The Future of COPD. *AJRCCM*, 2010;182: 598–604.
50. Rennard SI, Vestbo J. The many „small COPDs”: COPD should be an orphan disease. *Chest* 2008;134:623–627.
51. M. Weatherall, J. Travers, P.M. Shirlcliffe, és mtsai: Distinct clinical phenotypes of airways disease defined by cluster analysis. *ERJ* 2009;34:812–818
52. Hanania NA, Müllerova H, Locantore NW, Vestbo és mtsai: A Determinants of depression in the ECLIPSE chronic obstructive pulmonary disease cohort. Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (ECLIPSE) study investigators. *AJCCM* 2011;183:604-11.
53. Monso E, Rosell A, Bonet G, és munkatársai. Risk factors for lower airway bacterial colonization in chronic bronchitis. *Eur Respir J* 1999;13:338-42.
54. Gunen H, Hacıevliyagil SS, Kosar F, és munkatársai. Factors affecting survival of hospitalised patients with COPD. *Eur Respir J* 2005;26:234-41.
55. Kanner RE,, Anthonisen NR, Connet JE. Lower respiratory illnesses promote FEV(1) decline in current smokers but not ex-smokers with mild chronic obstructive pulmonary disease: results from the lung health study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:358-64.
57. Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002;57:847-52.
58. <http://www.goldcopd.org/guidelines-global-strategy-for-diagnosis-management.html> 2011.
59. American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *AJCCM*. 1995;152:S78-121.
60. Siafakis N.M., Vermeire P., Pride N.B, és mtsai: Optimal assesment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) *ERJ*. 1995;8:1398-1420.
61. <http://www.catesonline.org>
62. Anthonisen NR, Connett JE, Murray RP, for the Lung Health Study Research Group. Smoking and lung function of Lung Health Study participants after 11 years. *AJCCM* 2002;166: 675–679.
63. Agusti AG, Noguera A, Sauleda J és mtsai: Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *ERJ* 2003;21:347-360.
64. Wagner PD. Possible mechanisms uderlying ther development of cachexia in COPD. *Eur Respir J* 2008;31:492-501.
65. American Thoracic Society an European Respiratory Society. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:S1-40.
66. Mannino DM, Thorn D, Swensen A, Holguin F. Prevalence and outcomes of diabetes in COPD. *Eur Respir J* 2008;32:962-9.
67. Skillrud DM, Offord KP, Miller RD. Higher risk of lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, matched, controlled study. *Ann Intern Med* 1986;105:503-7.
68. Tockman MS, Anthonisen NR, Wright EC, Donithan MG. Airways obstruction and the risk for lung cancer. *Ann Intern Med* 1987;106:512-8.
69. J. B. Soriano, G. T. Visick, H. Muellerova, N. és mtsai: Patterns of Comorbidities in Newly Diagnosed COPD and Asthma in Primary Care. *Chest* 2005;128:2099-2107
70. Wouters EF, Creutzberg EC, Schols AM. Systemic effects in COPD. *Chest* 2002;121:127S-130S

71. Donaldson GC, Hurst JR, Smith CJ, és mtsai: Increased risk of myocardial infarction and stroke following exacerbation of COPD. *Chest* 2010; 137:1091–97.
72. Fabbri LM, Beghé B, Agusti A. Cardiovascular mechanisms of death in severe COPD exacerbation: time of thinking and acting beyond guidelines. *Thorax* 2011; 66:745–47.
73. Fabbri LM, Luppi F, Beghe B, és mtsai: Complex chronic comorbidities of COPD. *ERJ* 2008; 31:204–12.
74. K F Rabe, J A Wedzicha: Controversies in treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2011; 378: 1038–47
75. Agusti AG, Noguera A, Sauleda J és mtsai: Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *ERJ*; 2003;21:347-360.
76. K. Gruffydd-Jonesa, C. Loveridgeb The 2010 NICE COPD Guidelines: how do they compare with the GOLD guidelines? *Prim Care Respir J* 2011; 20:199-204
77. Vastag E.: A stabil COPD farmakoterápiája. *Med. thor.* 2004; Suppl. 1-15.
78. C. Fletcher, R. Peto: The natural history of chronic airflow obstruction. *BMJ*, 1977;1:1645-1648
79. Csányi E.: A COPD gyógyszeres kezelése napjainkban és a jövőben, *Családorvosi Fórum* 2006/9 12-18.
80. C. M Kozma, A. L. Paris, C. és mtsai: Comparison of resource use by COPD patients on inhaled therapies with long-acting bronchodilators: a database study *BMC Pulmonary Medicine* 2011; 11:61
81. G. K, McIvor RA, Xie F, Blackhouse G, R és mtsai: Triple therapy for the management of COPD. *COPD* 2011;8:206-43.
82. Penning-van Beest F, van Herk-Sukel M, Gale R, és mtsai: Three-year dispensing patterns with long-acting inhaled drugs in COPD: a database analysis. *Respir Med.* 2011;105:259-65.
83. J R, Ostrem A. Optimizing pharmacological maintenance treatment for chronic obstructive pulmonary disease in primary care. *Prim Care Respir J.* 2010;20:33-45.
84. Z. Csontos, J. Kappelmayer, E. Csányi: Oral sustained-release theophyllin (Retafyllin) Designed by ABBOTTBASE pharmacokinetic software *ERJ* 1995; 8:S19:99.
85. Vaskó A, Sz. Kiss S., Dévényi K., Ördög Cs., Szilasi M., Csányi E.: A volumenreduktio műtét, mint kezelési lehetőség korai stádiumú COPD terápiájában. *Orvosi Hetilap* 2006;147:43:2091-2096.
86. Loring S.H., Leith D.E., Conolly M.J. és mtsai: Model of function restriction in chronic obstructive pulmonary disease, transplantation, and lung reduction surgery. *AJRCCM*, 1999; 160, 821-828
87. Csányi E., Szabó P., Vaskó A. és mtsai: Végstádiumú tüdőbetegségben szenvedő betegek kezelése. *Orvosi Hetilap*, 2003; 15, 691-699
88. Csányi E: A betegek kiválasztása tüdőtranszplantációra és kezelésük a várólistán. *Orvosi Hetilap* 2006;147:2069-2074.
89. Csányi E. Boros P.: Szív és tüdőtranszplantáció, *Klinikai Immunológia Szerk. Dr. Czirják László* 680-683. Medicina könyvkiadó, Budapest, 2006;
90. Rabe KF, Wedzicha JA: Controversies in treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet.* 2011;378:1038-1047.
91. Lawes CM, Thornley S, Young R, és mtsai: Statin use in COPD patients is associated with a reduction in mortality: a national cohort study. *Prim Care Respir J.* 2012;21:35-40.
92. Mahler D.A., Huang S., Tabrizi M., és mtsai: Efficacy and safety of a monoclonal antibody recognizing interleukin-8 in COPD: a pilot study. *Chest* 2004; 126: 926–934.
93. Rennard S.I., Fogarty C., Kelsen S. és mtsai: The Safety and Efficacy of Infliximab in Moderate-To-Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *AJRCCM.* 2007; 175: 926–934.
94. Calverley P.M., Rabe K.F., Goehring U.M. és mtsai: Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials. *Lancet* 2009; 374: 685–694.
95. Fabbri L.M., Calverley P.M., Izquierdo-Alonso J.L. és mtsai: Roflumilast in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease treated with longacting bronchodilators: two randomised clinical trials. *Lancet* 2009; 374: 695–703.
96. De Swert KO, Joos GF: Extending the understanding of sensory neuropeptides. *Eur J Pharm.* 2006; 533: 171-81.
97. Mao J.T., Goldin J.G., Dermand J. és mtsai: A pilot study of alltrans-retinoic acid for the treatment of human emphysema. *AJRCCM.* 2002; 165: 718–723.
98. Roth M.D., Connett J.E., D’Armiento J.M. és mtsai: Feasibility of retinoids for the treatment of emphysema study. *Chest* 2006; 130: 1334–1345.
99. Massaro G., Massaro D. Retinoic acid treatment abrogates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Nature Medicine* 1997; 3: 675–677.
100. Vestbo J, Tan L, Atkinson G, Ward J; UK-500,001 Global Study Team. Csanky E, Namenyi M, Mark Z: A controlled trial of 6-weeks' treatment with a novel inhaled phosphodiesterase type-4 inhibitor in COPD. *ERJ* 2009; 33:1039-44.
101. Dr. Csányi Eszter: A krónikus obstruktív tüdőbetegség patogenezise – legfontosabb ismereteink 2011-ben. *Orvostovábbképző szemle* 2011;18;10. 11-18
102. Lange P., Parner J., Vestbo J és mtsai: A 15-yearfollow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *NEJM* 1998; 339: 1194–1200.
103. McCloskey SC, Patel BD, Hinchliffe SJ, Reid ED, Wareham NJ, Lomas DA. Siblings of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease have a significant risk of airflow obstruction. *AJRCCM* 2001;164:1419-24.
104. E K. Silverman: Progress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Genetics. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3:405–408

105. M D. Eisner, N Anthonisen, D Coultas, és mtsai, Environmental and Occupational Health Assembly Committee on Nonsmoking COPD. ATS Doc. An Official American Thoracic Society Public Policy Statement: Novel Risk Factors and the Global Burden of Chronic Obstructive Pulmonary Disease AJRCCM 2010; 182:693–718
106. Penyige A, Poliska Sz, Csanky E, és mtsai: Analyses of association between PPAR gamma and EPHX1 polymorphisms and susceptibility to COPD in a Hungarian cohort, a case-control study. BMC Medical Genetics 2010; 11:152-159
107. Peter J. Castaldi, Michael H. és mtsai.: The COPD genetic association compendium: a comprehensive online database of COPD genetic associations. Human Molecular Genetics, 2010;19:526–534
108. Poliska S, Csanky E, Szanto A, Takacs L, és mtsai: Respiration. Chronic Obstructive Pulmonary Disease-Specific Gene Expression Signatures of Alveolar Macrophages as well as Peripheral Blood Monocytes Overlap and Correlate with Lung Function. Respiration. 2011;81:499-510
109. Castaldi P.J., Cho M.H., Cohn M. és mtsai: The COPD genetic association compendium: a comprehensive online database of COPD genetic associations. Hum. Mol. Genet. 2009;19:526–534.
110. S I. Rennard: Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. Pneumon. Alergol. Pol. 2011;79:132–138
111. Dr. Szőnyi László: Alfa-1 antitripszin hiány jeletősége gyermekkori májbetegségekben és más immunopathomechanizmusú kórképekben. Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei
112. Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. Lancet 2005;365:2225-2236.
113. Stanescu D, Sanna A, Veriter C., és mtsai: Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. Thorax. 1996;51:267-71.
114. Jeffery PK: Structural and inflammatory changes in COPD Thorax, 1998;53:129
115. Seatta M: Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. AJRCCM, 1999;160:S17-20.
116. Majo J., Ghezzi H., Cosio MG.: Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. ERJ 2001; 17:946-53.
117. Park JA, He F, Martin LD, és mtsai: Human neutrophil elastase induces hypersecretion of mucin from well-differentiated human bronchial epithelial cells in vitro via a protein kinase C ζ -mediated mechanism. Am. J. Pathol. 2005;167:651–661.
118. Barnes PJ Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. Pharmacol Rev. 2004; 56: 515-48.
119. Saetta M, Baraldo S, Corbino L és mtsai: CD8+ cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. AJRCCM 1999; 160:711-7
120. O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, és mtsai: Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. AJRCCM 1997;155:852-7
121. Chrysafakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D, és mtsai: Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD. Chest. 2004, 125:71-76.
122. Saetta M, Mariani M, Panina-Bordignon P, és mtsai: Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. AJRCCM 2002;165:1404-9
123. Magnan AO, Mély LG, Camilla CA, és mtsai: Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. Increased IFN-gamma-producing CD8(+) T cells in asthma. AJRCCM 2000;161:1790-6.
124. Yousaf N, Birring SS, Pavord ID. The long-term outcome of patients with unexplained chronic cough. Thorax 2009;64: A16
125. Hogg J.C, Chu F., Utokaparch S. és mtsai: The nature of small airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. N. Engl. J. Med. 2004; 350: 2645–2653.
126. Lee S.H., Goswami S., Grudo A. és mtsai: Anti-elastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. Nat. Med. 2007; 13: 567–569
127. Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. Lancet 2009; 374: 733–43.
128. Birring SS, Morgan AJ, Prudon B, és mtsai: Respiratory symptoms in patients with treated hypothyroidism and inflammatory bowel disease. Thorax 2003; 58: 533–36.
129. Barnes PJ. Increased exhaled nitric oxide in asthma is mainly derived from the lower respiratory tract. JRCM 1996;153:1773–1780.
130. Brightling CE. Clinical applications of induced sputum. Chest 2006;129:1344–1348
131. Papi A, Romagnoli M, Baraldo S, és mtsai: Partial reversibility of airflow limitation and increased exhaled NO and sputum eosinophilia in chronic obstructive pulmonary disease. AJRCCM 2000; 162: 1773-7.
132. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. COPD: molecular and cellular mechanisms. ERJ 2003;22(4):672-88.
133. Carnevali S., Nakamura Y., Mio T. és mtsai: Cigarette smoke extract inhibits fibroblast-mediated collagen gel contraction. Am. J. Physiol. 1998; 274: L591–L598.
134. Togo S., Holz O., Liu X. és mtsai: Lung fibroblast repair functions in patients with chronic obstructive pulmonary disease are altered by multiple mechanisms. AJRCCM. 2008; 178: 248–260.
135. Ito K, Barnes PJ. COPD as a disease of accelerated lung aging. Chest 2009; 135: 173–180.
136. MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in COPD. Proc. Am. Thorac. Soc. 2005; 2: 50-60.
137. Hogg JC: Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. Lancet 2004; 364:709-21.
138. Barnes P.J. The cytokine network in asthma and COPD. J. Clin. Invest. 2008; 118: 3546–3556
139. Csanky E. Rühl R, Scholtz B és mtsai: Lipid metabolite levels of prostaglandin D2 and eicosapentaenoic acid recovered from bronchoalveolar lavage fluid correlate with lung function of chronic obstructive pulmonary disease patients and controls. Electrophoresis 2009; 30, 1–7
140. Arima M, Fukuda T: Prostaglandin D2 and T(H)2 inflammation in the pathogenesis of bronchial asthma. Korean J Intern Med. 2011;26:8-18.

141. Choi J, Zhang W, Gu X,: Lysophosphatidylcholine is generated by spontaneous deacylation of oxidized phospholipids. *Chem Res Toxicol.* 2011;24:111-8.
142. Lin P, Welch EJ, Gao XP, Malik AB, Ye RD. Lysophosphatidylcholine modulates neutrophil oxidant production through elevation of cyclic AMP. *J Immunol.* 2005;174:2981-9.
143. Weylandt KH, Chiu CY, Gomolka B, és mtsai: Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: Towards an understanding of resolvins and protectin formation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2012;97:73-82.
144. de Batlle J, Sauleda J, Balcells E, és mtsai: Association between $\Omega 3$ and $\Omega 6$ fatty acid intakes and serum inflammatory markers in COPD. *J Nutr Biochem.* PubMed PMID: 21889886.
145. Zhu D, Medhora M, Campbell WB, és mtsai: Chronic hypoxia 567activates lung 15-lipoxygenase, which catalyzes production of 15-HETE and 568 enhances constriction in neonatal rabbit pulmonary arteries. *Circulation Research* 2003;56992: 992–1000
146. Robinson NE, Derksen FJ, Olszewski MA, és mtsai: The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. *Br Vet J.* 1996;152:283-306.
147. Zhao J, O'Donnell VB, Balzar S, és mtsai: 15-Lipoxygenase 1 interacts with phosphatidylethanolamine-binding protein to regulate MAPK signaling in human airway epithelial cells. *PNAS* 2011;108:14246-51.
148. Yuan H, Li MY, Ma LT, és mtsai: 15-Lipoxygenases and its metabolites 15(S)-HETE and 13(S)-HODE in the development of non-small cell lung cancer. *Thorax.* 2010; 65:321-6.
149. Togo S., Holz O., Liu X. és mtsai: Lung fibroblast repair functions in patients with chronic obstructive pulmonary disease are altered by multiple mechanisms. *AJRCCM.* 2008; 178: 248–260.
150. Aoshiba K., Nagai A. Senescence hypothesis for the pathogenetic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2009; 6: 596–601.
151. C Svanes, J Sunyer, E Plana, és mtsai: Early life origins of chronic obstructive pulmonary disease *Thorax* 2010 65: 14-20
152. Issac HJ., Veenstra TD.: The role of electrophoresis in disease biomarker discovery. *Electrophoresis* 2007, 28: 1980-1988.
153. Pin I, Gibson, PG, Kolendovicz R, és mtsai: Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; 47:25-29.
154. Christopher E. Brightling, D.: Clinical Applications of Induced Sputum. *Chest.* 2006; 129:1344-1348.
155. Djukanovic R, Sterk PJ, Fahy JV, és mtsai.: Standardised methodology of sputum induction and processing. *ERJ* 2002;20: Suppl. 37 1s–55s.
156. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *AJRCCM*, 2001;163:1693–1722.
157. Kharitonov SA, Barnes PJ Exhaled biomarkers.*Chest.* 2006;130:1541-6.
158. Nightingale JA, Rogers, DF, Barnes PJ: Effect of repeated sputum induction on cell counts in normal volunteers. *Thorax*, 1998; 53: 87
159. Tomita K, Caramori G, Lim S, és mtsai: Increased p21(CIP1/WAF1) and B cell lymphoma leukemia-x(L) expression and reduced apoptosis in alveolar macrophages from smokers.*AJRCCM* 2002;166: 724-31.
160. Hill AT, Bayley D, Stockley RA,: The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis. *AJRCCM* 1999; 160:893-8.
161. Traves SL, Culpitt SV, Russell RE, és mtsai: Increased levels of the chemokines GRO alpha and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax* 2002; 57: 590.
162. Rahman I., Kelly F.: Biomarkers in breath condensate: a promising new non-invasive technique in free radical research *Free Radic Res.* 2003; 37:1253-1266.
163. Antzack A., Gorski P.: Markers of pulmonary diseases in exhaled breath condensate. *Int. J. Occupational Med. and Environmental Health*, 2002;15: 317-323.
164. Kharitonov SA, Barnes PJ: Exhaled markers of inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immun.* 2001;1:217-224.
165. Montuschi P, Barnes PJ. Roberts LJ: Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J* 2004;18:1791–1800.
166. Csányi E, Takács L: A biomarkerek szerepe a COPD pathogenezisében *Tüdőgyógyászat*, 2007, 12: 3-11.
167. Traves SL, Smith SJ, Barnes PJ, és mtsai: Specific CXC but not CC chemokines cause elevated monocyte migration in COPD: a role for CXCR2.*J Leukoc Biol.* 2004;76:441-50.
168. Hodge SJ, Hodge GL, Reynolds PN, és mtsai: Increased production of TGF-beta and apoptosis of T lymphocytes isolated from peripheral blood in COPD.*Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003; 285:492-9.
169. Gan WQ, Man SFP, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004;59:574–580.
170. Stolz D, Christ-Crain M , Bingisser R , és mtsai:Antibiotic treatment of exacerbations of COPD: a randomized, controlled trial comparing procalcitonin-guidance with standard therapy. *Chest* 2007; 131:119
171. Franciosi LG, Page CP, Celli BR, és mtsai: Markers of exacerbation severity in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res.* 2006; 7:74.
172. Igishi T, Hitsuda Y, Kato K, és mtsai: Elevated urinary 8-hydroxydeoxyguanosine, a biomarker of oxidative stress, and lack of association with antioxidant vitamins in chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology.* 2003;8:455-60.
173. Takacs L, Parallel Biology: A Systematic Approach to Drug Target and Biomarker Discovery in Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Immunogenomics and Human Disease, Wiley and Sons Ltd. Ed: A. Falus. 2005.
174. Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault J-C. Lung volume and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the ERJ. 1993; 6: Suppl. 16, 5–40.
175. M.R. Miller, J. Hankinson, V. Brusasco, F. és mtsai: Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26: 319–338

176. H. Klech' and C. Hutter Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL) : Report of the European Society of bPneumology Task Group on BAL Eur Respir J 1990, 3, 937-974
177. E. Csanky, P. Olivova, E. Rajnavolgyi, és mtsai: Monoclonal Antibody Proteomics: Discovery and Pre-Validation of COPD Biomarkers in a Single Step. Elektroforézis 2007; 28:4401–4406
178. Harlow, E., Lane, D., Antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1988.
179. Bristol, L. A., Finch, L., Romm, E. :Characterization of a novel rat thymocyte costimulating antigen by the monoclonal antibody 1.3.Immunol. 1992;148:332-338.
180. Rühl, R.: Method to determine 4-oxo-retinoic acids, retinoic acids and retinol in serum and cell extracts by liquid chromatography/diode-array detection atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry. Rapid. Commun. Mass Spectrom, 2006; 20:2497-2504.
181. Köhler, G:Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.Nature.1975;256:495-506.
182. Schrattenholz A., Groebe K.: What does it need to be a biomarker? Relationships between resolution differential quantification and statistical validation of protein surrogate biomarkers. Electrophoresis 2007; 28:1970- 1979.
183. Tzortzaki EG, Lambiri I, Vlachaki E, és mtsai: Biomarkers in COPD. Curr Med Chem. 2007; 14:1037-48.
184. Tzortzaki EG, Tsoumakidou M, Makris D és mtsai: Laboratory markers for COPD in "susceptible" smokers. Clin Chim Acta. 2006;364:124-38.
185. Righetti PG, Castagna A, Antonucci F, és mtsai: Proteome analysis in the clinical chemistry laboratory: myth or reality? Clin Chim Acta. 2005;357:123-39.
186. Gilbert K, Figueredo S, Meng XY, Yip C, Fung ET. Serum protein-expression profiling using the ProteinChip biomarker system. Methods Mol Biol. 2004;264:259-69.
187. Albrethsen J. Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry. Clin Chem. 2007;53:852-8.
188. Qian WJ, Jacobs JM, Liu T, Camp DG 2nd, Smith RD. Advances and challenges in liquid chromatography-mass spectrometry-based proteomics profiling for clinical applications. Mol Cell Proteomics. 2006;10:1727-44.
189. YJ, Zhan P, Feild B, Ruben SM, He T. Reproducibility assessment of relative quantitation strategies for LC-MS based proteomics. Anal Chem. 2007; 79:5651-8.
190. Maurya P, Meleady P, Dowling P, Clynes M. Proteomic approaches for serum biomarker discovery in cancer. Anticancer Res. 2007; 3A::1247-55.
191. Yocum AK, Busch CM, Felix CA, Blair IA. Proteomics-based strategy to identify biomarkers and pharmacological targets in leukemias with t(4;11) translocations. J Proteome Res. 2006;10:2743-53.
192. Zieske LR. A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. J Exp Bot. 2006;57:1501-8.
193. Borrebaeck CA, Wingren C: High-throughput proteomics using antibody microarrays: an update. Expert Rev Mol Diagn. 2007;7:673-686.
194. Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattini G, Barnes PJ. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. Thorax 2003;8:585-8.
195. Stebbins KJ, Broadhead AR, Baccei és mtsai: Pharmacological blockade of the DP2 receptor inhibits cigarette smoke-induced inflammation, mucus cell metaplasia, and epithelial hyperplasia in the mouse lung. J Pharmacol Exp Ther. 2010;332:764-75.
196. Norman P. DP(2) receptor antagonists in development. Expert Opin InvestigDrugs. 2010;19:947-61

8. TÁRGYSZAVAK

COPD,
Biomarker,
Monoklonális antitest,
Lipidek,
Bronchoalveoláris lavage,
Légzésfunkció
Emphysema
Kronikus bronchitis
Dohányzás
Prostaglandin D₂

8.1 KEY WORDS

COPD
Biomarker
Monoclonal antibody
Lipids
Bronchoalveolar lavage
Lung function
Emphysema
Chronic bronchitis
Smoking
Prostaglandin D₂

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hatékony tudományos munkát csak csapatok tudnak végezni. Az eredmények eléréséhez segítők munkatársak kellene. A felsorolás teljessége nélkül köszönöm munkatársaimnak munkáját, támogatását, segítségét.

DR. TAKÁCS LÁSZLÓ AKADÉMIKUS úrral a közös munkánk 1999-ben kezdődött. Olyan kutatási, gondolkozási, oknyomozási szemléletet tanított nekem, amely nélkül a hátköznapi munkáimat is kevésbé sikeresen tudnám végezni. – Lehetőséget teremtett arra, hogy a DIMITRI MONOS PROFESSZOR ÚR philadelphiai laboratóriumában elkezdett tudományos kutatásaimat tudjam Magyarországon folytatni.

DR. GERGELY PÁL AKADÉMIKUS ÚR, – a DEOEC tudományos igazgatója – engem jelölt ki a Pfizerrel végzett COPD alapkutatási kooperáció klinikus vezetőjének 1999-ben.

DR. FÉSŰS LÁSZLÓ AKADÉMIKUS ÚR biztosította a szakmai és tudományos háttérét munkánknak. A Ph.D. megírására ösztönzött

DEOEC TUDÓGYÓGYÁSZATI KLINIKÁN köszönöm munkatársaimnak, a klinikai team-nek a lekiismeretes magas színvonalú munkáját, azt a támogatást és azt a szeretetet, amelyet mostoha körülmények között végzett munkánk során kaptam tőlük. Köszönöm a klinikai team minden tagjának külön-külön a segítségét!

A KLINIKAI TEAM TAGJAI: BODNÁR ZSUZSA, DR. CSAPÓ KÁLMÁNNÉ, DR. DÉVÉNYI KATALIN, DR. DEZSŐ BALÁZS, RÁDULY MÁRIA, DR. SZABÓ PÉTER, DR. SZ. KISS SÁNDOR, TÖLGYESI TITANILLA, DR. VASKÓ ATTILA

DEOEC BIOKÉMIAI ÉS MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI INTÉZET MUNKATÁRSAI A KUTATÓ CSAPAT: DR. NAGY LÁSZLÓ AKADÉMIKUS ÚR, DR. SCHOLTZ BEÁTA – a közel 10 éves munka tudományos tervezésének a meghatározó tényezői voltak, és a laboratóriumi vizsgálatok kivitelezésének rányitói.

A KUTATÓ CSOPORT TAGJA: (a teljesség igénye nélkül) DR. SZATMÁRI ISTVÁN, DR. SZÁNTÓ ATTILA, DR. RALPH RHÜL, DR. BUSLIG JÚLIA, FÜRTÖS IBOLYA, DR. POLISKA SZILÁRD, DR. PENYIGE ANDRÁS

DR. RAJNAVÖLGYI ÉVA PROFESSZOR ASSZONY meghatározó szerepet átszott a proteomikai munkánk megvalósításában

BIOSYSTEMS INTERNATIONAL MAGYARORSZÁGI CSAPATÁNAK MUNKÁJÁT: ÉLESNÉ TÓTH KATALIN, DR. GUTTMAN ANDRÁS AKADÉMIKUS ÚR, DR. KÁDAS JÁNOS, DR. KURUCZ ISTVÁN.

BIOSYSTEMS INTERNATIONAL FRANCIAORSZÁGI DOLGOZÓINAK MUNKÁJÁT: WILLIAM HEMPEL, MARIANA KURAS, WILLIAM HANCOCK, BARRY KARGER,

KÖSZÖNÖM A PFIZER FRESNES – SANDWICH kutatóinak a munkáját.

A KUTATÓ CSAPAT TAGJAI: PETRA OLIVOVA, WILLIAM HEMPEL, NADEGE TARDIEU, ANNE JULLIEN, CAROLE MALDERES-BLOES, MARIANA KURAS, MANUEL DUVAL WILLIAM HANCOCK, BARRY KARGER,

Köszönöm **JELENLEGI MUNKATÁRSAIM, MISKOLCI SEMMELWEIS IGNÁC** Egészségügyi Központ és Egyetemi Oktató **KÓRHÁZ Non Profit Kft. TUDÓGYÓGYÁSZATI OSZTÁLY DOLGOZÓINAK** és a **KÓRHÁZ VEZETÉSÉNEK**, hogy mellettem álltak, és segítettek a disszertáció befejezésében és az utolsó simításokban.

Végül, de nem utolsó sorban a munkák alatt a **CSALÁDOM** volt a segítő háttér és a szenvedő alany egyidőben – **ISTVÁN, LILI, ÉS LEVENTE.**

10. FÜGGELÉK:
A PH.D ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK
MELLÉKELVE

Csánky, E., Rühl, R., Scholtz, B., Vaskó, A., Takács, L., Hempel, W.: Lipid metabolite levels of prostaglandin D2 and eicosapentaenoic acid recovered from bronchoalveolar lavage fluid correlate with lung function of chronic obstructive pulmonary disease patients controls. *Electrophoresis*. 30 (7), 1228-1234, 2009.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200800722>

IF:3.077

Csánky, E., Olivova, P., Rajnavölgyi, É., Hempel, W., Tardieu, N., Élesné Tóth, K., Jullien, A., Malderez-Bloes, C., Kuras, M., Duval, M.X., Nagy, L., Scholtz, B., Hancock, W., Karger, B., Guttman, A., Takács, L.: Monoclonal antibody proteomics: Discovery and prevalidation of chronic obstructive pulmonary disease biomarkers in a single step. *Electrophoresis*. 28 (23), 4401-4406, 2007.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200700256>

IF:3.609

Csánky E.: A krónikus obstruktív tüdőbetegség patogenezeise: Legfontosabb ismereteink 2011-ben.

Orvostovábbk. Szle. 18 (10), 11-18, 2011.

Csánky E., Takács L.: A biomarkerek szerepe a COPD patogenezisében és diagnosztikájában. *Tüdőgyógyászat* 1 (12), 3-11, 2007.

Csánky E.: A betegek kiválasztása tüdőtranszplantációra és kezelésük a várólistán töltött idő alatt.

Orv. Hetil. 147 (43), 2069-2074, 2006.

Vaskó A., Kiss S.S., Dévényi K., Ördög C., Szilasi M., **Csánky E.:** A volumenredukciós műtét, mint kezelési lehetőség a korai stádiumú krónikus obstruktív tüdőbetegség terápiájában. *Orv. Hetil.* 147 (43), 2091-2096, 2006.

Csánky E.: A COPD gyógyszeres kezelése napjainkban és a jövőben.

Családorv. F. 9, 12-18, 2006.

7.2 IDÉZETT KÖZLEMÉNYEK

- ¹ <http://www.goldcopd.org/guidelines-global-strategy-for-diagnosis-management.html>
- ² Shapiro S.D., Reilly J.J.J., Rennard S.I. Chronic Bronchitis and Emphysema. In: Mason R.J., Martin T.R., King T.E., és mtsai (eds.). Nadel Textbook of Respiratory Medicine, Vol. I. Saunders, Philadelphia 2010; 919–967.
- ³ Viegi G, Pistelli F, Sherrill DL, és mtsai: Definition, epidemiology and natural history of COPD. ERJ, 2007; 30: 993–1013.
- ⁴ European Respiratory Society/European Lung Foundation. European Lung White Book. The First Comprehensive Survey on Respiratory Health in Europe. Loddenkemper R, Gibson GJ, Sibille Y, eds. Sheffield, ERSJ, 2003.
- ⁵ Fukuchi Y, Nishimura M, Ichinose M, et al. COPD in Japan: the Nippon COPD Epidemiology study. Respirology 2004; 9:458–465
- ⁶ COPD prevalence in 12 Asia-Pacific countries and regions: projections based on the COPD prevalence estimation model. Respirology. 2003;8:192-8
- ⁷ Anto J.M., Vermeire P., Vestbo J., és mtsai: Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. ERJ, 2001;17:982-994.
- ⁸ C. Raheison, P. O. Girodet: Epidemiology of COPD. Eur Respir Rev 2009;18:213–221
- ⁹ Mathers CD, Loncar D (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLoS Med 3(11): e442. doi:10. 1371/journal.pmed.0030442
- ¹⁰ Gershon AS, Warner L, Cascagnette P, és mtsai: Lifetime risk of developing chronic obstructive pulmonary disease: a longitudinal population study. Lancet. 2011;378:991-996.
- ¹¹ Viegi G, Scognamilio A, Baldacci S és mtsai: Epidemiology of chronic pulmonary disease (COPD). Respiration, 2001; 68: 4-19.
- ¹² Murray CJL, Lopez AD. Evidence-based health policy-lessons from the Global Burden of Disease Study. Science 1996; 274:740-743.
- ¹³ Rennard S, Vestbo J.:COPD: the dangerous under estimated of 15%. Lancet 2006; 367:1216-1219.
- ¹⁴ Mathers CD, Loncar D (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. PLoS Med 3(11): e442. doi:10. 1371/journal.pmed.0030442
- ¹⁵ Strausz J, Böszörményi Nagy Gy, Csekeő A, és mtsai: A pulmonológiai intézmények 2010 évi epidemiológiai és működési adatai. Korányi Bulletin 2011. 1
- ¹⁶ Szabó T.: Háromszázezer ismeretlen betegért a COPD-ről. Magyar Orvos 2006, 14: 23-26.
- ¹⁷ Somfay A, Jeney E: Spirometriás szűrés COPD-ben országos reprezentatív minta alapján. Med. Thor. 2006;59:2-6.
- ¹⁸ Böszörményi Nagy Gy.: A krónikus obstruktív légúti betegség (COPD) diagnosztikája és kezelése, Med. Thor 2006; 57:157-170.
- ¹⁹ Vastag E.:A COPD klinikai és funkcionális jellemzői, diagnosztizálása, prognózisa, Háziorvos Továbbképző Szemle 1996;1: 196-198.
- ²⁰ Károlyi A.: Krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD), Orvosi Hetilap, 2001;142: 2.
- ²¹ Hurd S: The impact of COPD on lung health worldwide: Chest. 2000;117:1S–4S.
- ²² Behrendt CE. Mild and moderate-to-severe COPD in non-smokers. Distinct demographic profiles. Chest 2005; 128:1239-44.
- ²³ Anthonisen NR, Connett JE, Murray RP. Smoking and lung function of Lung Health Study participants after 11 years. Am J Respir Crit Care Med 2002; 166:675-9.
- ²⁴ Eisner MD, Anthonisen N, Coultas D, és munkatársai. An official American Thoracic Society public policy statement: Novel risk factors and the global burden of chronic obstructive pulmonary disease. Am J respir Crit Care Med 2010;182:693-718.
- ²⁵ Lamprecht B, McBurnie MA, Vollmer WM, és munkatársai. COPD in never smokers: results from the population-based burden of obstructive lung disease study. Chest 2011; 139:752-63.
- ²⁶ Barker D.J., Godfrey K.M., Fall C. és mtsai: Relation of birthweight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease. BMJ 1991; 303: 671–675.
- ²⁷ Silverman EK, Weiss ST, Drazen JM, és mtsai. Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. AJCCM. 2000;162:2152–8
- ²⁸ M. Foreman, L. Zhang, J. Murphy, és mtsai: Early-Onset Chronic Obstructive Pulmonary Disease Is Associated with Female Sex, Maternal Factors, and African American Race in the COPD Gene Study Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2011; 184: 414-420.
- ²⁹ Foreman MG, Zhang L, Murphy J, és munkatársai. Early-onset chronic obstructive pulmonary disease is associated with female sex, maternal factors, and African American race in the COPD Gene Study. Am J Respir Crit Care Med 2011;184:414-20.
- ³⁰ Silverman EK, Weiss ST, Drazen JM, és munkatársai. Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. Am J Crit Care Med 2000;162:2152-8.

³¹ López Varela MV, Montes de Oca M.: Variability in COPD: The PLATINO Study Viewpoint. *Arch Bronconeumol.* 2012;48(4):105–106

³² McCloskey SC, Patel BD, Hinchliffe SJ, Reid ED, Wareham NJ, Lomas DA. Siblings of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease have a significant risk of airflow obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1419-24.

Pillai SG, GE D, Zhu G, Kong X, Shianna KV, Need AD és munkatársai. A genome-wide association study in chronic obstructive pulmonary disease (COPD): identification of two major susceptibility loci. *PLoS Genet* 2009;5:e1000421.

Repapi E, Sayers I, Wai LV, és munkatársai. Genome-wide association study identifies five loci associated with lung function. *Nat Genet* 2010;42:36-44.

Foreman MG, Zhang L, Murphy J, és munkatársai. Early-onset chronic obstructive pulmonary disease is associated with female sex, maternal factors, and African American race in the COPD Gene Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:414-20.

Silverman EK, Weiss ST, Drazen JM, és munkatársai. Gender-related differences in severe, early-onset chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Crit Care Med* 2000;162:2152-8.

³³ Todisco T, de Benedictis FM, Iannacci L, és munkatársai. Mild prematurity and respiratory functions. *Eur J Pediatr* 1993;152:55-8.

³⁴ Barker DJ, Godfrey KM, Fall C, Osmond C, Winter PD, Shaheen SO. Relation of birth weight and childhood respiratory infection to adult lung function and death from chronic obstructive airways disease. *BMJ* 1991;303:671-5.

³⁵ Stern DA, Morgan WJ, Wright AL, Guerra S, Martinez FD. Poor airway function in early infancy and lung function by age 22 years: a non-selective longitudinal cohort study. *Lancet* 2007;370:758-64.

³⁶ Crothers K HL, Goulet JL, Goetz MB, Brown ST. HIV infection and risk for incident pulmonary diseases in the combination antiretroviral therapy era. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:388-95.

³⁷ Lam KB, Jiang Cq, Jordan RE, és munkatársai. Prior TB, smoking, and airflow obstruction: a cross-sectional analysis of the Guangzhou Biobank Cohort Study. *Chest*;137:593-600.

³⁸ Jordan TS, Spencer EM, Davies P. Tuberculosis, bronchiectasis and chronic airflow obstruction. *Respirology* 2012;15:623-8.

³⁹ World Health Report. Geneva: World Health Organization: <http://www.who.int/whr/2000/en/statistics.htm>;

⁴⁰ ATS. Chronic bronchitis, asthma and pulmonary emphysema: statement by the Committee on Diagnostic Standards for non Tuberculous Respiratory Diseases. *ARRD* 1962; 5:762 –768

⁴¹ Morgagni JB. The seats and causes of diseases investigated by anatomy. London: Millar 1769;1:361 Hafner Publishing. (in: Rooke GB.: The pathology of byssinosis. *Chest.* 1981;79:67S-71S)

⁴² Nas Es, Brisco WA Cournand A: The relationship between clinical and physiological findings in chronic obstructive disease of the lungs. *Med Thorac.* 1965;22:305-27.

⁴³ Brisco WA: The variability of behavior within the emphysematous lung. *ARRD.* 1959;80:136-7.

⁴⁴ Snider GL, Kleinerman J, Thurlbeck WM, és mtsai: The definition of emphysema: report of a National Heart, Lung and Blood Institute, Div. of Lung Diseases, Workshop. *ARRD* 1985;132: 182–185.

⁴⁵ Han M.K, Agusti A, Calverley PM, és mtsai: COPD Phenotypes: The Future of COPD. *AJRCCM*, 2010;182: 598–604.

⁴⁶ Rennard SI, Vestbo J. The many „small COPDs”: COPD should be an orphan disease. *Chest* 2008;134:623–627.

⁴⁷ M. Weatherall, J. Travers, P.M. Shirtcliffe, és mtsai: Distinct clinical phenotypes of airways disease defined by cluster analysis. *ERJ* 2009;34:812–818

⁴⁸ Hanania NA, Müllerova H, Locantore NW, Vestbo és mtsai: A Determinants of depression in the ECLIPSE chronic obstructive pulmonary disease cohort. Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (ECLIPSE) study investigators. *AJCCM* 2011;183:604-11.

- ⁴⁹ Monso E, Rosell A, Bonet G, és munkatársai. Risk factors for lower airway bacterial colonization in chronic bronchitis. *Eur Respir J* 1999;13:338-42.
- ⁵⁰ Gunen H, Hacievliyagil SS, Kosar F, és munkatársai. Factors affecting survival of hospitalised patients with COPD. *Eur Respir J* 2005;26:234-41.
- ⁵¹ Kanner RE, Anthonisen NR, Connet JE. Lower respiratory illnesses promote FEV(1) decline in current smokers but not ex-smokers with mild chronic obstructive pulmonary disease: results from the lung health study. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:358-64.
- ⁵² Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A, Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002;57:847-52.
- ⁵³ <http://www.goldcopd.org/guidelines-global-strategy-for-diagnosis-management.html> 2011.
- ⁵⁴ American Thoracic Society. Standards for the diagnosis and care of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *AJCCM*. 1995;152:S78-121.
- ⁵⁵ Siafakis N.M., Vermeire P., Pride N.B, és mtsai: Optimal assesment and management of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) *ERJ*. 1995;8:1398-1420.
- ⁵⁶ <http://www.catesonline.org>
- ⁵⁷ Anthonisen NR, Connett JE, Murray RP, for the Lung Health Study Research Group. Smoking and lung function of Lung Health Study participants after 11 years. *AJCCM* 2002;166: 675–679.
- ⁵⁸ Agusti AG, Noguera A, Sauleda J és mtsai: Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *ERJ* 2003;21:347-360.
- ⁵⁹ Wagner PD. Possible mechanisms uderlying ther development of cachexia in COPD. *Eur Respir J* 2008;31:492-501.
- ⁶⁰ American Thoracic Society an European Respiratory Society. Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:S1-40.
- ⁶¹ Mannino DM, Thorn D, Swensen A, Holquin F. Prevalence and outcomes of diabetes in COPD. *Eur Respir J* 2008;32:962-9.
- ⁶² Skillrud DM, Offord KP, Miller RD. Higher risk of lung cancer in chronic obstructive pulmonary disease. A prospective, matched, controlled study. *Ann Intern Med* 1986;105:503-7.
- ⁶³ Tockman MS, Anthonisen NR, Wright EC, Donithan MG. Airways obstruction and the risk for lung cancer. *Ann Intern Med* 1987;106:512-8.
- ⁶⁴ J. B. Soriano, G. T. Visick, H. Muellerova, N. és mtsai: Patterns of Comorbidities in Newly Diagnosed COPD and Asthma in Primary Care. *Chest* 2005;128:2099-2107
- ⁶⁵ Wouters EF, Creutzberg EC, Schols AM. Systemic effects in COPD. *Chest* 2002;121:127S-130S
- ⁶⁶ Donaldson GC, Hurst JR, Smith CJ, és mtsai: Increased risk of myocardial infarction and stroke following exacerbation of COPD. *Chest* 2010; 137:1091–97.
- ⁶⁷ Fabbri LM, Beghé B, Agusti A. Cardiovascular mechanisms of death in severe COPD exacerbation: time of thinking and acting beyond guidelines. *Thorax* 2011; 66:745–47.
- ⁶⁸ Fabbri LM, Luppi F, Beghe B, és mtsa: Complex chronic comorbidities of COPD. *ERJ* 2008; 31:204–12.
- ⁶⁹ K F Rabe, J A Wedzicha: Controversies in treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2011; 378: 1038–47
- ⁷⁰ Agusti AG, Noguera A, Sauleda J és mtsai: Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *ERJ*; 2003;21:347-360.
- ⁷¹ K. Gruffydd-Jonesa, C. Loveridgeb The 2010 NICE COPD Guidelines: how do they compare with the GOLD guidelines? *Prim Care Respir J* 2011; 20:199-204
- ⁷² Vastag E.: A stabil COPD farmakoterápiája. *Med. thor.* 2004; Suppl. 1-15.
- ⁷³ C. Fletcher, R. Peto: The natural history of chronic airflow obstruction. *BMJ*, 1977;1:1645-1648
- ⁷⁴ Csányi E.: A COPD gyógyszeres kezelése napjainkban és a jövőben. *Családorvosi Fórum* 2006/9 12-18.
- ⁷⁵ C. M Kozma, A. L. Paris, C. és mtsa: Comparison of resource use by COPD patients on inhaled therapies with long-acting bronchodilators: a database study *BMC Pulmonary Medicine* 2011; 11:61
- ⁷⁶ G. K, McIvor RA, Xie F, Blackhouse G, R és mtsai: Triple therapy for the management of COPD. *COPD* 2011;8:206-43.
- ⁷⁷ Penning-van Beest F, van Herk-Sukel M, Gale R, és mtsai: Three-year dispensing patterns with long-acting inhaled drugs in COPD: a database analysis. *Respir Med.* 2011;105:259-65.

- ⁷⁸ J R, Ostrem A. Optimizing pharmacological maintenance treatment for chronic obstructive pulmonary disease in primary care. *Prim Care Respir J*. 2010;20:33-45.
- ⁷⁹ Z. Csonotos, J. Kappelmayer, E. **Csányi**: Oral sustained-release theophyllin (Retafyllin) Designed by ABBOTTBASE pharmacokinetic software *ERJ* 1995; 8:S19:99.
- ⁸⁰ Vaskó A, Sz. Kiss S., Dévényi K., Ördög Cs., Szilasi M., **Csányi E.**: A volumenreduktio műtét, mint kezelési lehetőség korai stádiumú COPD terápiájában. *Orvosi Hetilap* 2006;147:43:2091-2096.
- ⁸¹ Loring S.H., Leith D.E., Conolly M.J. és mtsai: Model of function restriction in chronic obstructive pulmonary disease, transplantation, and lung reduction surgery. *AJRCCM*, 1999; 160, 821-828
- ⁸² **Csányi E.**, Szabó P., Vaskó A. és mtsai: Végstádiumú tüdőbetegségben szenvedő betegek kezelése. *Orvosi Hetilap*, 2003; 15, 691-699
- ⁸³ **Csányi E.**: A betegek kiválasztása tüdőtranszplantációra és kezelésük a várólistán. *Orvosi Hetilap* 2006;147:2069-2074.
- ⁸⁴ **Csányi E.** Boros P.: Szív és tüdőtranszplantáció, Klinikai Immunológia Szerk. Dr. Czirják László 680-683. Medicina könyvkiadó, Budapest, 2006;
- ⁸⁵ Rabe KF, Wedzicha JA: Controversies in treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2011;378:1038-1047.
- ⁸⁶ Lawes CM, Thornley S, Young R, és mtsai: Statin use in COPD patients is associated with a reduction in mortality: a national cohort study. *Prim Care Respir J*. 2012;21:35-40.
- ⁸⁷ Mahler D.A., Huang S., Tabrizi M., és mtsai: Efficacy and safety of a monoclonal antibody recognizing interleukin-8 in COPD: a pilot study. *Chest* 2004; 126: 926-934.
- ⁸⁸ Rennard S.I., Fogarty C., Kelsen S. és mtsai: The Safety and Efficacy of Infliximab in Moderate-To-Severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *AJRCCM*. 2007; 175: 926-934.
- ⁸⁹ Calverley P.M., Rabe K.F., Goehring U.M. és mtsai: Roflumilast in symptomatic chronic obstructive pulmonary disease: two randomised clinical trials. *Lancet* 2009; 374: 685-694.
- ⁹⁰ Fabbri L.M., Calverley P.M., Izquierdo-Alonso J.L. és mtsai: Roflumilast in moderate-to-severe chronic obstructive pulmonary disease treated with longacting bronchodilators: two randomised clinical trials. *Lancet* 2009; 374: 695-703.
- ⁹¹ De Swert KO, Joos GF: Extending the understanding of sensory neuropeptides. *Eur J Pharm*. 2006; 533: 171-81.
- ⁹² Mao J.T., Goldin J.G., Derman J. és mtsai: A pilot study of alltrans-retinoic acid for the treatment of human emphysema. *AJRCCM*. 2002; 165: 718-723.
- ⁹³ Roth M.D., Connett J.E., D'Armiento J.M. és mtsai: Feasibility of retinoids for the treatment of emphysema study. *Chest* 2006; 130: 1334-1345.
- ⁹⁴ Massaro G., Massaro D. Retinoic acid treatment abrogates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Nature Medicine* 1997; 3: 675-677.
- ⁹⁵ Vestbo J, Tan L, Atkinson G, Ward J; UK-500,001 Global Study Team. **Csanky E**, Namenyi M, Mark Z: A controlled trial of 6-weeks' treatment with a novel inhaled phosphodiesterase type-4 inhibitor in COPD. *ERJ* 2009; 33:1039-44.
- ⁹⁶ **Dr. Csányi Eszter**: A krónikus obstruktív tüdőbetegség patogenezise – legfontosabb ismereteink 2011-ben. *Orvostovábbképző szemle* 2011;18;10. 11-18
- ⁹⁷ Lange P., Parner J., Vestbo J és mtsai: A 15-yearfollow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *NEJM* 1998; 339: 1194-1200.
- ⁹⁸ McCloskey SC, Patel BD, Hinchliffe SJ, Reid ED, Wareham NJ, Lomas DA. Siblings of patients with severe chronic obstructive pulmonary disease have a significant risk of airflow obstruction. *AJRCCM* 2001;164:1419-24.
- ⁹⁹ E K. Silverman: Progress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Genetics. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3:405-408
- ¹⁰⁰ M D. Eisner, N Anthonisen, D Coultas, és mtsai, Environmental and Occupational Health Assembly Committee on Nonsmoking COPD. ATS Doc.An Official American Thoracic Society Public Policy Statement: Novel Risk Factors and the Global Burden of Chronic Obstructive Pulmonary Disease *AJRCCM* 2010; 182:693-718
- ¹⁰¹ Penyige A, Poliska Sz, **Csanky E**, és mtsai: Analyses of association between PPAR gamma and EPHX1 polymorphisms and susceptibility to COPD in a Hungarian cohort, a case-control study. *BMC Medical Genetics* 2010; 11:152-159
- ¹⁰² Peter J. Castaldi, Michael H. és mtsai.: The COPD genetic association compendium: a comprehensive online database of COPD genetic associations. *Human Molecular Genetics*, 2010;19:526-534
- ¹⁰³ Poliska S, **Csanky E**, Szanto A, Takacs L, és mtsai: Respiration. Chronic Obstructive Pulmonary Disease-Specific Gene Expression Signatures of Alveolar Macrophages as well as Peripheral Blood Monocytes Overlap and Correlate with Lung Function. *Respiration*. 2011;81:499-510
- ¹⁰⁴ Castaldi P.J., Cho M.H., Cohn M. és mtsai: The COPD genetic association compendium: a comprehensive online database of COPD genetic associations. *Hum. Mol. Genet*. 2009;19:526-534.
- ¹⁰⁵ S I. Rennard: Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Pneumon. Alergol. Pol*. 2011;79:132-138
- ¹⁰⁶ Dr. Szőnyi László: Alfa-1 antitripszin hiány jeletősége gyermekkori májbetegségekben és más immun-pathomechanizmusú kórképekben. Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei
- ¹⁰⁷ Stoller JK, Aboussouan LS. Alpha1-antitrypsin deficiency. *Lancet* 2005;365:2225-2236.
- ¹⁰⁸ Stanescu D, Sanna A, Veriter C., és mtsai: Airways obstruction, chronic expectoration, and rapid decline of FEV1 in smokers are associated with increased levels of sputum neutrophils. *Thorax*. 1996;51:267-71.
- ¹⁰⁹ Jeffery PK: Structural and inflammatory changes in COPD *Thorax*, 1998;53:129
- ¹¹⁰ Seatta M: Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *AJRCCM*, 1999;160:S17-20.
- ¹¹¹ Majo J., Ghezzi H., Cosio MG.: Lymphocyte population and apoptosis in the lungs of smokers and their relation to emphysema. *ERJ* 2001; 17:946-53.
- ¹¹² Park JA, He F, Martin LD, és mtsai: Human neutrophil elastase induces hypersecretion of mucin from well-differentiated human bronchial epithelial cells in vitro via a protein kinase C ϵ -mediated mechanism. *Am. J. Pathol*. 2005;167:651-661.
- ¹¹³ Barnes PJ Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev*.2004; 56: 515-48.

- ¹¹⁴ Saetta M, Baraldo S, Corbino L és mtsai: CD8+ cells in the lungs of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *AJRCCM* 1999; 160:711-7
- ¹¹⁵ O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, és mtsai: Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. *AJRCCM* 1997;155:852-7
- ¹¹⁶ Chrysafakis G, Tzanakis N, Kyriakoy D, és mtsai: Perforin expression and cytotoxic activity of sputum CD8+ lymphocytes in patients with COPD. *Chest*. 2004, 125:71-76.
- ¹¹⁷ Saetta M, Mariani M, Panina-Bordignon P, és mtsai: Increased expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in peripheral airways of smokers with chronic obstructive pulmonary disease. *AJRCCM* 2002;165:1404-9
- ¹¹⁸ Magnan AO, Mély LG, Camilla CA, és mtsai: Assessment of the Th1/Th2 paradigm in whole blood in atopy and asthma. Increased IFN-gamma-producing CD8(+) T cells in asthma. *AJRCCM* 2000;161:1790-6.
- ¹¹⁹ Yousaf N, Birring SS, Pavord ID. The long-term outcome of patients with unexplained chronic cough. *Thorax* 2009;64: A16
- ¹²⁰ Hogg J.C, Chu F., Utokaparch S. és mtsai: The nature of smallairway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350: 2645–2653.
- ¹²¹ Lee S.H., Goswami S., Grudo A. és mtsai: Antielastin autoimmunity in tobacco smoking-induced emphysema. *Nat. Med.* 2007; 13: 567–569
- ¹²² Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers. *Lancet* 2009; 374: 733–43.
- ¹²³ Birring SS, Morgan AJ, Prudon B, és mtsai: Respiratory symptoms in patients with treated hypothyroidism and inflammatory bowel disease. *Thorax* 2003; 58: 533–36.
- ¹²⁴ Barnes PJ. Increased exhaled nitric oxide in asthma is mainly derived from the lower respiratory tract. *JRCCM* 1996;153:1773–1780.
- ¹²⁵ Brightling CE. Clinical applications of induced sputum. *Chest* 2006;129:1344–1348
- ¹²⁶ Papi A, Romagnoli M, Baraldo S, és mtsai: Partial reversibility of airflow limitation and increased exhaled NO and sputum eosinophilia in chronic obstructive pulmonary disease. *AJRCCM* 2000; 162: 1773-7.
- ¹²⁷ Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. COPD: molecular and cellular mechanisms. *ERJ* 2003;22(4):672-88.
- ¹²⁸ Carnevali S., Nakamura Y., Mio T. és mtsai: Cigarette smoke extract inhibits fibroblast-mediated collagen gel contraction. *Am. J. Physiol.* 1998; 274: L591–L598.
- ¹²⁹ Togo S., Holz O., Liu X. és mtsai: Lung fibroblast repair functions in patients with chronic obstructive pulmonary disease are altered by multiple mechanisms. *AJRCCM.* 2008; 178: 248–260.
- ¹³⁰ Ito K, Barnes PJ. COPD as a disease of accelerated lung aging. *Chest* 2009; 135: 173–180.
- ¹³¹ MacNee W. Pulmonary and systemic oxidant/antioxidant imbalance in COPD. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2005; 2: 50–60.
- ¹³² Hogg JC: Pathophysiology of airflow limitation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 2004; 364:709-21.
- ¹³³ Barnes P.J. The cytokine network in asthma and COPD. *J. Clin. Invest.* 2008; 118: 3546–3556
- ¹³⁴ Csanky E, Rühl R, Scholtz B és mtsai: Lipid metabolite levels of prostaglandin D2 and eicosapentaenoic acid recovered from bronchoalveolar lavage fluid correlate with lung function of chronic obstructive pulmonary disease patients and controls. *Electrophoresis* 2009; 30, 1–7
- ¹³⁵ Arima M, Fukuda T: Prostaglandin D2 and T(H)2 inflammation in the pathogenesis of bronchial asthma. *Korean J Intern Med.* 2011;26:8-18.
- ¹³⁶ Choi J, Zhang W, Gu X,: Lysophosphatidylcholine is generated by spontaneous deacylation of oxidized phospholipids. *Chem Res Toxicol.* 2011;24:111-8.
- ¹³⁷ Lin P, Welch EJ, Gao XP, Malik AB, Ye RD. Lysophosphatidylcholine modulates neutrophil oxidant production through elevation of cyclic AMP. *J Immunol.* 2005;174:2981-9.
- ¹³⁸ Weylandt KH, Chiu CY, Gomolka B, és mtsai: Omega-3 fatty acids and their lipid mediators: Towards an understanding of resolvins and protectin formation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2012;97:73-82.
- ¹³⁹ de Batlle J, Sauleda J, Balcells E, és mtsai: Association between Ω 3 and Ω 6 fatty acid intakes and serum inflammatory markers in COPD. *J Nutr Biochem.* PubMed PMID: 21889886.
- ¹⁴⁰ Zhu D, Medhora M, Campbell WB, és mtsai: Chronic hypoxia 567activates lung 15-lipoxygenase, which catalyzes production of 15-HETE and 568 enhances constriction in neonatal rabbit pulmonary arteries. *Circulation Research* 2003;56992: 992–1000
- ¹⁴¹ Robinson NE, Derksen FJ, Olszewski MA, és mtsai: The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. *Br Vet J.* 1996;152:283-306.
- ¹⁴² Zhao J, O'Donnell VB, Balzar S, és mtsai: 15-Lipoxygenase 1 interacts with phosphatidylethanolamine-binding protein to regulate MAPK signaling in human airway epithelial cells. *PNAS* 2011;108:14246-51.
- ¹⁴³ Yuan H, Li MY, Ma LT, és mtsai: 15-Lipoxygenases and its metabolites 15(S)-HETE and 13(S)-HODE in the development of non-small cell lung cancer. *Thorax.* 2010; 65:321-6.
- ¹⁴⁴ Togo S., Holz O., Liu X. és mtsai: Lung fibroblast repair functions in patients with chronic obstructive pulmonary disease are altered by multiple mechanisms. *AJRCCM.* 2008; 178: 248–260.
- ¹⁴⁵ Aoshiba K., Nagai A. Senescence hypothesis for the pathogenetic mechanism of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2009; 6: 596–601.
- ¹⁴⁶ C Svanes, J Sunyer, E Plana, és mtsai: Early life origins of chronic obstructive pulmonary disease *Thorax* 2010 65: 14-20
- ¹⁴⁷ Issac HJ., Veenstra TD.: The role of electrophoresis in disease biomarker discovery. *Electrophoresis* 2007, 28: 1980-1988.
- ¹⁴⁸ Pin I, Gibson, PG, Kolendovicz R, és mtsai: Use of induced sputum cell counts to investigate airway inflammation in asthma. *Thorax* 1992; 47:25-29.
- ¹⁴⁹ Christopher E. Brightling, D.: Clinical Applications of Induced Sputum. *Chest.* 2006; 129:1344-1348.

- ¹⁵⁰ Djukanovic R, Sterk PJ, Fahy JV, és mtsai.: Standardised methodology of sputum induction and processing. *ERJ* 2002;20: Suppl. 37 1s–55s.
- ¹⁵¹ Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *AJRCCM*, 2001;163:1693–1722.
- ¹⁵² Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled biomarkers. *Chest*. 2006;130:1541-6.
- ¹⁵³ Nightingale JA, Rogers DF, Barnes PJ: Effect of repeated sputum induction on cell counts in normal volunteers. *Thorax*, 1998; 53: 87
- ¹⁵⁴ Tomita K, Caramori G, Lim S, és mtsai: Increased p21(CIP1/WAF1) and B cell lymphoma leukemia-x(L) expression and reduced apoptosis in alveolar macrophages from smokers. *AJRCCM* 2002;166: 724-31.
- ¹⁵⁵ Hill AT, Bayley D, Stockley RA.: The interrelationship of sputum inflammatory markers in patients with chronic bronchitis. *AJRCCM* 1999; 160:893-8.
- ¹⁵⁶ Traves SL, Culpitt SV, Russell RE, és mtsai: Increased levels of the chemokines GRO alpha and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD. *Thorax* 2002; 57: 590.
- ¹⁵⁷ Rahman I, Kelly F.: Biomarkers in breath condensate: a promising new non-invasive technique in free radical research *Free Radic Res*. 2003; 37:1253-1266.
- ¹⁵⁸ Antzack A., Gorski P.: Markers of pulmonary diseases in exhaled breath condensate. *Int. J. Occupational Med. and Environmental Health*, 2002;15: 317-323.
- ¹⁵⁹ Kharitonov SA, Barnes PJ: Exhaled markers of inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immun.* 2001;1:217-224.
- ¹⁶⁰ Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ: Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J* 2004;18:1791–1800.
- ¹⁶¹ Csányi E, Takács L: A biomarkerek szerepe a COPD pathogenezisében *Tüdőgyógyászat*, 2007, 12: 3-11.
- ¹⁶² Traves SL, Smith SJ, Barnes PJ, és mtsai: Specific CXC but not CC chemokines cause elevated monocyte migration in COPD: a role for CXCR2. *J Leukoc Biol*. 2004;76:441-50.
- ¹⁶³ Hodge SJ, Hodge GL, Reynolds PN, és mtsai: Increased production of TGF-beta and apoptosis of T lymphocytes isolated from peripheral blood in COPD. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003; 285:492-9.
- ¹⁶⁴ Gan WQ, Man SFP, Senthilselvan A, Sin DD. Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta-analysis. *Thorax* 2004;59:574–580.
- ¹⁶⁵ Stolz D , Christ-Crain M , Bingisser R , és mtsai:Antibiotic treatment of exacerbations of COPD: a randomized, controlled trial comparing procainonin-guidance with standard therapy. *Chest* 2007; 131:119
- ¹⁶⁶ Franciosi LG, Page CP, Celli BR, és mtsai: Markers of exacerbation severity in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2006; 7:74.
- ¹⁶⁷ Igishi T, Hitsuda Y, Kato K, és mtsai: Elevated urinary 8-hydroxydeoxyguanosine, a biomarker of oxidative stress, and lack of association with antioxidant vitamins in chronic obstructive pulmonary disease. *Respirology*. 2003;8:455-60.
- ¹⁶⁸ Takacs L, Parallel Biology: A Systematic Approach to Drug Target and Biomarker Discovery in Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Immunogenomics and Human Disease, Wiley and Sons Ltd. Ed: A. Falus. 2005.
- ¹⁶⁹ Quanjer PH, Tammeling GJ, Cotes JE, Pedersen OF, Peslin R, Yernault J-C. Lung volume and forced ventilatory flows. Report Working Party Standardization of Lung Function Tests, European Community for Steel and Coal. Official Statement of the ERJ. 1993; 6: Suppl. 16, 5–40.
- ¹⁷⁰ M.R. Miller, J. Hankinson, V. Brusasco, F. és mtsai: Standardisation of spirometry. *Eur Respir J* 2005; 26: 319–338
- ¹⁷¹ H. Klech' and C. Hutter Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage (BAL) : Report of the European Society of bPneumology Task Group on BAL *Eur Respir J* 1990, 3, 937-974
- ¹⁷² E. Csanky, P. Olivova, E. Rajnavolgyi, és mtsai: Monoclonal Antibody Proteomics: Discovery and Pre-Validation of COPD Biomarkers in a Single Step. *Elektroforézis* 2007; 28:4401–4406
- ¹⁷³ Harlow, E., Lane, D., Antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1988.
- ¹⁷⁴ Bristol, L. A., Finch, L., Romm, E. :Characterization of a novel rat thymocyte costimulating antigen by the monoclonal antibody 1.3. *Immunol*. 1992;148:332-338.
- ¹⁷⁵ Rühl, R.: Method to determine 4-oxo-retinoic acids, retinoic acids and retinol in serum and cell extracts by liquid chromatography/diode-array detection atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass Spectrom*, 2006; 20:2497-2504.
- ¹⁷⁶ Köhler, G:Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*.1975;256:495-506.
- ¹⁷⁷ Schratzenholz A., Groebe K.: What does it need to be a biomarker? Relationships between resolution differential quantification and statistical validation of protein surrogate biomarkers. *Electrophoresis* 2007; 28:1970- 1979.
- ¹⁷⁸ Tzortzaki EG, Lambiri I, Vlachaki E, és mtsai: Biomarkers in COPD. *Curr Med Chem*. 2007; 14:1037-48.
- ¹⁷⁹ Tzortzaki EG, Tsoumakidou M, Makris D és mtsai: Laboratory markers for COPD in "susceptible" smokers. *Clin Chim Acta*. 2006;364:124-38.
- ¹⁸⁰ Righetti PG, Castagna A, Antonucci F, és mtsai: Proteome analysis in the clinical chemistry laboratory: myth or reality? *Clin Chim Acta*. 2005;357:123-39.
- ¹⁸¹ Gilbert K, Figueroa S, Meng XY, Yip C, Fung ET. Serum protein-expression profiling using the ProteinChip biomarker system. *Methods Mol Biol*. 2004;264:259-69.
- ¹⁸² Albrechtsen J. Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Chem*. 2007;53:852-8.
- ¹⁸³ Qian WJ, Jacobs JM, Liu T, Camp DG 2nd, Smith RD. Advances and challenges in liquid chromatography-mass spectrometry-based proteomics profiling for clinical applications. *Mol Cell Proteomics*. 2006;10:1727-44.
- ¹⁸⁴ YJ, Zhan P, Feild B, Ruben SM, He T. Reproducibility assessment of relative quantitation strategies for LC-MS based proteomics. *Anal Chem*. 2007; 79:5651-8.
- ¹⁸⁵ Maurya P, Meleady P, Dowling P, Clynes M. Proteomic approaches for serum biomarker discovery in cancer. *Anticancer Res*. 2007; 3A::1247-55.
- ¹⁸⁶ Yocum AK, Busch CM, Felix CA, Blair IA. Proteomics-based strategy to identify biomarkers and pharmacological targets in leukemias with t(4;11) translocations. *J Proteome Res*. 2006;10:2743-53.

-
- ¹⁸⁷ Zieske LR. A perspective on the use of iTRAQ reagent technology for protein complex and profiling studies. *J Exp Bot.* 2006;57:1501-8.
- ¹⁸⁸ Borrebaeck CA, Wingren C: High-throughput proteomics using antibody microarrays: an update. *Expert Rev Mol Diagn.* 2007;7:673-686.
- ¹⁸⁹ Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattini G, Barnes PJ. Exhaled leukotrienes and prostaglandins in COPD. *Thorax* 2003;8:585-8.
- ¹⁹⁰ Stebbins KJ, Broadhead AR, Baccei és mtsai: Pharmacological blockade of the DP2 receptor inhibits cigarette smoke-induced inflammation, mucus cell metaplasia, and epithelial hyperplasia in the mouse lung. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;332:764-75.
- ¹⁹¹ Norman P. DP(2) receptor antagonists in development. *Expert Opin InvestigDrugs.* 2010;19:947-61